

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(57) Abrégé L'invention concerne une nouvelle protéine à activité urate oxydase qui a la séquence (I), précédée éventuellement d'une méthionine, ou en ce qu'elle présente un degré d'homologie substantiel avec cette séquence. L'invention a également pour objet les médicaments contenant cette protéine ainsi que les outils de génie génétique pour l'obtenir.

DESIGNATIONS DE "DE"

Jusqu'à nouvel avis, toute désignation de "DE" dans toute demande internationale dont la date de dépôt international est antérieure au 3 octobre 1990 a effet dans le territoire de la République fédérale d'Allemagne à l'exception du territoire de l'ancienne République démocratique allemande.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

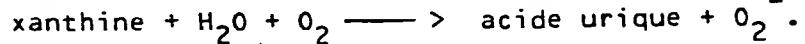
AT	Autriche	ES	Espagne	MC	Monaco
AU	Australie	FI	Finlande	MG	Madagascar
BB	Barbade	FR	France	ML	Mali
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Fasso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	HU	Hongrie	NO	Norvège
BR	Brésil	IT	Italie	PL	Pologne
CA	Canada	JP	Japon	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
DE	Allemagne	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DK	Danemark			TC	Togo
				US	Etats-Unis d'Amérique

Protéine à activité urate oxydase, gène recombinant codant pour celle-ci, vecteur d'expression, micro-organismes et cellules transformées.

05 L'invention concerne une nouvelle protéine à activité urate oxydase, un médicament contenant celle-ci et les outils de génie génétique pour produire cette protéine et notamment un gène recombinant, un vecteur d'expression portant ce gène, les micro-organismes procaryotes et les cellules eucaryotes transformées par ce vecteur d'expression.

10 L'urate oxydase (EC 1.7.3.3.), également dénommée uricase, est une enzyme de la voie de dégradation des purines. Cette enzyme n'existe pas chez les primates (comme l'Homme), les oiseaux, quelques reptiles ni chez la plupart des insectes. Certains chiens (comme le dalmatien) en sont également dépourvus.

15 Chez l'homme, les bases puriques, adénine et guanine, sont converties en xanthine. La xanthine est oxydée par la xanthine oxydase pour former l'acide urique selon la réaction :



20 Le radical O_2^- , substrat de la superoxyde dismutase, est transformé par cette dernière en peroxyde d'hydrogène.

25 L'acide urique, métabolite présent dans le sang, se trouve normalement essentiellement sous forme de sel monosodique soluble. Toutefois, il peut arriver que, chez certaines personnes, l'acide urique précipite et forme des calculs. L'hyperuricémie, augmentation de la quantité d'acide urique en circulation dans le sang, cause le dépôt d'acide urique dans les tissus cartilagineux, ce qui entraîne la goutte. L'hyperuricémie peut également avoir des 30 conséquences sur les reins : un excès d'acide urique dans l'urine et dans les reins peut conduire à une néphrolithiase à acide urique, c'est-à-dire à l'accumulation de calculs rénaux qui sont très douloureux et peuvent endommager le rein. Ces calculs sont composés d'acide urique éventuellement associé avec des sels phosphates et oxalates.

La surproduction d'acide urique peut avoir des origines diverses : défauts métaboliques congénitaux, syndrome de Lesch-Nyhan, l'ingestion en excès de purine ou de protéines, traitements avec des drogues uricosuriques, traitement des hémopathies, notamment cancéreuses à l'aide des cytolytiques (chimiothérapie) ou par radiothérapie, etc. (Gutman, AB et YU, T.F. (1968) Am. J. Med. 45 - 756-779).

L'urate oxydase, enzyme qui catalyse la dégradation de l'acide urique en allantoïne (composé beaucoup plus soluble que l'acide urique, ne cristallisant pas aux concentrations atteintes dans les liquides biologiques), présente donc un intérêt thérapeutique. Utilisée en injection, elle présente un grand nombre d'avantages dans le traitement de l'hyperuricémie et des néphrolithiasies : rapidité de l'effet hypo-uricémiant (diminution de l'ordre de 50 % de l'hyperuricémie en moins de 24 h), meilleure protection du rein contre les lithiasies par rapport à d'autres drogues comme l'allopurinol (inhibiteur de la xanthine oxydase), etc. Cette enzyme est actuellement principalement utilisée comme adjuvant des cytolytiques en chimiothérapie.

L'urate oxydase utilisée actuellement comme médicament est obtenue selon un procédé comprenant la culture d'un mycélium d'*Aspergillus flavus* et l'isolement de l'urate oxydase par extraction du milieu de culture ainsi que plusieurs étapes de purification partielle de cette protéine. Ce procédé, qui permet l'obtention d'urate oxydase d'activité spécifique urate oxydase voisine de 8 U/mg, dépourvue de contaminants toxiques, présente toutefois des inconvénients. En effet, la physiologie et surtout la génétique d'*A. flavus* ne sont pas aisément travaillables (WOLOSHUK et al, (1989) Applied environ. microbiol. vol. 55, p. 86-90). Il n'est donc pas possible d'obtenir des souches qui produisent cette enzyme en quantités importantes. D'autre part, *A. flavus* est susceptible de produire des aflatoxines, lesquelles sont parfois difficiles à séparer. Il convient donc de vérifier que le produit purifié est exempt de ces toxines.

IL existe donc un besoin pour une urate oxydase d'A. flavus plus pure ainsi que des outils et des techniques de génie génétique permettant de s'affranchir de ces inconvénients.

La demanderesse a purifié l'urate oxydase extraite d'A. flavus, appelée ci-après urate oxydase extractive, à un degré de pureté très supérieur à celui déjà connu de cette protéine, déterminé la séquence partielle de celle-là et construit deux pools de sondes marquées susceptibles de s'hybrider avec les nucléotides codant pour deux portions de cette protéine. Elle a ensuite construit un vecteur d'expression comprenant cet ADNc, transformé une souche d'E. coli K12 avec ce dernier, cultivé celle-ci et vérifié que le lysat des cellules contenait une protéine recombinante de la masse moléculaire attendue, qui possède une activité urate oxydase (capacité de dégrader l'acide urique en allantoïne).

La demanderesse a également construit plusieurs vecteurs d'expression dans les cellules eucaryotes comprenant un géne recombinant codant pour l'urate oxydase dont la séquence comporte des variations par rapport à l'ADNc isolé, introduites dans le but de mettre en place des codons usuels dans les cellules eucaryotes, transformé différentes cellules eucaryotes à l'aide de ces vecteurs, cultivé celles-ci en faible volume ainsi qu'en volume plus important (fermenteur) et constaté que les lysats des cellules contenaient un taux important de protéine recombinante de la masse moléculaire attendue possédant une activité urate oxydase.

Elle a purifié cette protéine recombinante et caractérisé partiellement celle-ci, de façon comparative vis-à-vis de l'urate oxydase extractive.

L'invention concerne donc une nouvelle protéine caractérisée en ce qu'elle présente une activité urate oxydase spécifique d'au moins 16 U/mg, en ce qu'elle a la séquence ci-après :

Ser Ala Val Lys Ala Ala Arg Tyr Gly Lys Asp Asn Val Arg Val Tyr Lys
Val His Lys Asp Glu Lys Thr Gly Val Gln Thr Val Tyr Glu Met Thr Val
Cys Val Leu Leu Glu Gly Glu Ile Glu Thr Ser Tyr Thr Lys Ala Asp Asn
35 Ser Val Ile Val Ala Thr Asp Ser Ile Lys Asn Thr Ile Tyr Ile Thr Ala

Lys Gln Asn Pro Val Thr Pro Pro Glu Leu Phe Gly Ser Ile Leu Gly Thr
His Phe Ile Glu Lys Tyr Asn His Ile His Ala Ala His Val Asn Ile Val
Cys His Arg Trp Thr Arg Met Asp Ile Asp Gly Lys Pro His Pro His Ser
Phe Ile Arg Asp Ser Glu Glu Lys Arg Asn Val Gln Val Asp Val Val Glu
05 Gly Lys Gly Ile Asp Ile Lys Ser Ser Leu Ser Gly Leu Thr Val Leu Lys
Ser Thr Asn Ser Gln Phe Trp Gly Phe Leu Arg Asp Glu Tyr Thr Thr Leu
Lys Glu Thr Trp Asp Arg Ile Leu Ser Thr Asp Val Asp Ala Thr Trp Gln
Trp Lys Asn Phe Ser Gly Leu Gln Glu Val Arg Ser His Val Pro Lys Phe
Asp Ala Thr Trp Ala Thr Ala Arg Glu Val Thr Leu Lys Thr Phe Ala Glu
10 Asp Asn Ser Ala Ser Val Gln Ala Thr Met Tyr Lys Met Ala Glu Gln Ile
Leu Ala Arg Gln Gln Leu Ile Glu Thr Val Glu Tyr Ser Leu Pro Asn Lys
His Tyr Phe Glu Ile Asp Leu Ser Trp His Lys Gly Leu Gln Asn Thr' Gly
Lys Asn Ala Glu Val Phe Ala Pro Gln Ser Asp Pro Asn Gly Leu Ile Lys
15 Cys Thr Val Gly Arg Ser Ser Leu Lys Ser Lys Leu, précédée éventuellement
d'une méthionine, ou en ce qu'elle présente un degré d'homologie
substantiel avec cette séquence.

De préférence, cette protéine a une activité urate oxydase spécifique d'environ 30 U/mg.

Une protéine de ce type appréciée est celle qui, par analyse sur un gel bidimensionnel présente un spot de masse moléculaire d'environ 33,5 kDa et de point isoélectrique voisin de 8,0 représentant au moins 90 % de la masse protéique.

De préférence le taux de pureté de cette protéine déterminé par chromatographie liquide sur une colonne de silice greffée C8 est supérieur à 80 %.

Une protéine intéressante de ce type est celle qui a un point isoélectrique voisin de 8,0. On apprécie que la sérine amino-terminale porte un groupement bloquant, de préférence de masse voisine de 43 unités de masse atomique, tel que par exemple le groupe acétyle.

L'invention a également trait au médicament qui contient, dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable, la protéine définie précédemment. Celle-ci peut remplacer avantageusement, dans ses différentes indications, l'urate oxydase extractive d'activité urate oxydase spécifique voisine de 8 U/mg vendue en préparation injectable sous la marque Uricozyme (Vidal 1990).

L'invention concerne aussi un gène recombinant caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'ADN codant pour la protéine de séquence ci-après :

05 Met Ser Ala Val Lys Ala Ala Arg Tyr Gly Lys Asp Asn Val Arg Val Tyr Lys Val His Lys Asp Glu Lys Thr Gly Val Gln Thr Val Tyr Glu Met Thr Val Cys Val Leu Leu Glu Gly Glu Ile Glu Thr Ser Tyr Thr Lys Ala Asp Asn Ser Val Ile Val Ala Thr Asp Ser Ile Lys Asn Thr Ile Tyr Ile Thr Ala Lys Gln Asn Pro Val Thr Pro Pro Glu Leu Phe Gly Ser Ile Leu Gly 10 Thr His Phe Ile Glu Lys Tyr Asn His Ile His Ala Ala His Val Asn Ile Val Cys His Arg Trp Thr Arg Met Asp Ile Asp Gly Lys Pro His Pro His Ser Phe Ile Arg Asp Ser Glu Glu Lys Arg Asn Val Gln Val Asp Val Val Glu Gly Lys Gly Ile Asp Ile Lys Ser Ser Leu Ser Gly Leu Thr Val Leu Lys Ser Thr Asn Ser Gln Phe Trp Gly Phe Leu Arg Asp Glu Tyr Thr Thr 15 Leu Lys Glu Thr Trp Asp Arg Ile Leu Ser Thr Asp Val Asp Ala Thr Trp Gln Trp Lys Asn Phe Ser Gly Leu Gln Glu Val Arg Ser His Val Pro Lys Phe Asp Ala Thr Trp Ala Thr Ala Arg Glu Val Thr Leu Lys Thr Phe Ala Glu Asp Asn Ser Ala Ser Val Gln Ala Thr Met Tyr Lys Met Ala Glu Gln Ile Leu Ala Arg Gln Gln Leu Ile Glu Thr Val Glu Tyr Ser Leu Pro Asn 20 Lys His Tyr Phe Glu Ile Asp Leu Ser Trp His Lys Gly Leu Gln Asn Thr Gly Lys Asn Ala Glu Val Phe Ala Pro Gln Ser Asp Pro Asn Gly Leu Ile Lys Cys Thr Val Gly Arg Ser Ser Leu Lys Ser Lys Leu

A cause de la dégénérescence du code génétique, il existe un grand nombre de séquences d'ADN codant pour une protéine dont la 25 séquence répond à la formule donnée ci-dessus. Parmi celles-ci une séquence préférée particulièrement adaptée pour une expression dans les micro-organismes procaryotes est la suivante :

30 ATGTCTGCGG TAAAAGCAGC GCGCTACGGC AAGGACAATG TTGCGGTCTA
CAAGGTTCAC AAGGACGAGA AGACCGGTGT CCAGACGGTG TACGAGATGA
CCGTCTGTGT GCTTCTGGAG GGTGAGATTG AGACCTCTTA CACCAAGGCC
GACAACAGCG TCATTGTCGC AACCGACTCC ATTAAGAACCA CCATTTACAT
CACCAGCAAG C-GAACCCCG TTACTCCTCC CGAGCTGTTG GGCTCCATCC
TGGGCACACA CTTCATTGAG AAGTACAACC ACATCCATGC CGCTCACGTC
35 AACATTGTCT GCCACCGCTG GACCCGGATG GACATTGACG GCAAGCCACA
CCCTCACTCC TTCATCCGCG ACAGCGAGGA GAAGCGGAAT GTGCAGGTGG

ACGTGGTCGA GGGCAAGGGC ATCGATATCA AGTCGTCTCT GTCCGGCCTG
ACCGTGCTGA AGAGCACCAA CTCGCAGTTC TGGGGCTTCC TGC GTGACGA
GTACACCACA CTTAAGGAGA CCTGGGACCG TATCCTGAGC ACCGACGTCG
ATGCCACTTG GCAGTGGAAAG AATTTCAGTG GACTCCAGGA GGTCCGCTCG
05 CACGTGCCTA AGTTCGATGC TACCTGGGCC ACTGCTCGCG AGGTCACTCT
GAAGACTTTT GCTGAAGATA ACAGTGCCAG CGTGCAGGCC ACTATGTACA
AGATGGCAGA GCAAATCCTG GCGCGCCAGC AGCTGATCGA GACTGTCGAG
TACTCGTTGC CTAACAAGCA CTATTCGAA ATCGACCTGA GCTGGCACAA
10 GGGCCTCCAA AACACCGGCA AGAACGCCGA GGTCTTCGCT CCTCAGTCGG
ACCCCAACGG TCTGATCAAG TGTACCGTCG GCCGGTCCTC TCTGAAGTCT
AAATTG.

Une autre séquence d'ADN préférée qui convient notamment pour l'expression dans les cellules eucaryotes, telles que la levure, est la suivante :

ATGTCTGCTG TTAAGGCTGC TAGATACGGT AAGGACAACG TTAGAGTCTA
CAAGGTTCAC AAGGACGAGA AGACCGGTGT CCAGACGGTG TACGAGATGA
20 CCGTCTGTGT GCTTCTGGAG GGTGAGATTG AGACCTCTTA CACCAAGGCC
GACAACAGCG TCATTGTCGC AACCGACTCC ATTAAGAACCA CCATTTACAT
CACCGCCAAG CAGAACCCCCG TTACTCCTCC CGAGCTGTTG GGCTCCATCC
TGGGCACACA CTTCATTGAG AAGTACAACC ACATCCATGC CGCTCACGTC
AACATTGTCT GCCACCGCTG GACCCGGATG GACATTGACG GCAAGGCCACA
25 CCCTCACTCC TTCATCCGCG ACAGCGAGGA GAAGCGGAAT GTGCAGGTGG
ACGTGGTCGA GGGCAAGGGC ATCGATATCA AGTCGTCTCT GTCCGGCCTG
ACCGTGCTGA AGAGCACCAA CTCGCAGTTC TGGGGCTTCC TGC GTGACGA
GTACACCACA CTTAAGGAGA CCTGGGACCG TATCCTGAGC ACCGACGTCG
ATGCCACTTG GCAGTGGAAAG AATTTCAGTG GACTCCAGGA GGTCCGCTCG
30 CACGTGCCTA AGTTCGATGC TACCTGGGCC ACTGCTCGCG AGGTCACTCT
GAAGACTTTT GCTGAAGATA ACAGTGCCAG CGTGCAGGCC ACTATGTACA
AGATGGCAGA GCAAATCCTG GCGCGCCAGC AGCTGATCGA GACTGTCGAG
TACTCGTTGC CTAACAAGCA CTATTCGAA ATCGACCTGA GCTGGCACAA
GGGCCTCCAA AACACCGGCA AGAACGCCGA GGTCTTCGCT CCTCAGTCGG
35 ACCCCCAACGG TCTGATCAAG TGTACCGTCG GCCGGTCCTC TCTGAAGTCT
AAATTG.

Une autre séquence d'ADN préférée qui convient notamment pour une expression dans les cellules animales est la suivante :

05	5'-ATGTC	CGCAGTAAAA	GCAGCCCGCT	ACGGCAAGGA
	CAATGTCCGC	GTCTACAAGG	TTCACAAGGA	CGAGAAGACC
	CGGTGTACGA	GATGACCGTC	TGTGTGCTTC	TGGAGGGTGA
	TCTTACACCA	AGGCCGACAA	CAGCGTCATT	GTCGCAACCG
	GAACACCATT	TACATCACCG	CCAAGCAGAA	CCCCGTTACT
10	TGTCGGCTC	CATCCTGGGC	ACACACTTCA	TTGAGAAAGTA
	CATGCCGCTC	ACGTCAACAT	TGTCTGCCAC	CGCTGGACCC
	TGACGGCAAG	CCACACCCCTC	ACTCCTTCAT	CCGCGACAGC
	GGAATGTGCA	GGTGGACGTG	GTCGAGGGCA	AGGGCATCGA
	TCTCTGTCCG	GCCTGACCGT	GCTGAAGAGC	ACCAACTCGC
15	CTTCCTGCGT	GACGAGTACA	CCACACTTAA	GGAGACCTGG
	TGAGCACCGA	CGTCGATGCC	ACTTGGCAGT	GGAAGAATT
	CAGGAGGTCC	GCTCGCACGT	GCCTAAGTTC	GATGCTACCT
	TCGCGAGGTC	ACTCTGAAGA	CTTTGCTGA	AGATAACAGT
	AGGCCACTAT	GTACAAGATG	GCAGAGCAAA	TCCTGGCGCG
20	ATCGAGACTG	TCGAGTACTC	GTTGCCTAAC	AAGCACTATT
	CCTGAGCTGG	CACAAGGGCC	TCCAAAACAC	CGGCAAGAAC
	TCGCTCCTCA	GTCGGACCCC	AACGGTCTGA	TCAAGTGTAC
	TCCTCTCTGA	AGTCTAAATT	G	CGTCGGCCGG

25 précédée d'une séquence 5' non traduite favorable à l'expression dans les cellules animales. Une telle séquence 5' non traduite préférée est celle qui comprend la séquence : AGCTTGCCGCCACT, située immédiatement en amont de la séquence explicitée ci-dessus.

30 On notera que la protéine codée par les séquences d'ADNc données ci-dessus peut subir une maturation par la méthionyl-amino-peptidase, qui la clive de son résidu méthionine amino-terminal.

L'invention concerne également un vecteur d'expression qui porte, avec les moyens nécessaires à son expression, le gène recombinant défini précédemment.

05 Pour une expression dans les micro-organismes prokaryotes, en particulier dans *Escherichia coli*, la séquence codante doit être insérée dans un vecteur d'expression comportant notamment un promoteur efficace, suivi d'un site de fixation des ribosomes en amont du gène à exprimer, ainsi qu'une séquence d'arrêt de transcription efficace en aval du gène à exprimer. Ce plasmide doit également comporter une origine de réPLICATION et un marqueur de sélection. Toutes ces séquences doivent être choisies en fonction de la cellule hôte.

10 Pour une expression dans les cellules eucaryotes, le vecteur d'expression selon l'invention porte le gène recombinant défini précédemment avec les moyens nécessaires à son expression, à sa réPLICATION dans les cellules eucaryotes et à la sélection des cellules transformées. De préférence, ce vecteur porte un marqueur 15 de sélection, choisi par exemple pour complémenter une mutation des cellules eucaryotes réceptrices, qui permet la sélection des cellules qui ont intégré le gène recombinant en un nombre de copies élevé soit dans leur génome, soit dans un vecteur multicopie.

20 Pour une expression dans les cellules animales, notamment dans les cellules d'ovaires de hamster chinois CHO, la séquence codante est insérée dans un plasmide (par exemple dérivé du pBR 322) comportant deux unités d'expression, une première unité dans laquelle est inséré le gène recombinant devant un promoteur efficace (par exemple le promoteur précoce de SV40). La séquence autour 25 de l'ATG d'initiation est de préférence choisie en fonction de la séquence consensus décrite par KOZAK (M. KOZAK (1978) *Cell.*, 15, 1109-1123). Une séquence intronique, par exemple l'intron de l'α-globine de souris, peut être insérée en amont du gène recombinant ainsi qu'une séquence comportant un site de polyadénylation, par 30 exemple une séquence de polyadénylation du SV40, en aval du gène recombinant. La deuxième unité d'expression comporte un marqueur de sélection (par exemple une séquence d'ADN) codant pour la dihydrofolate réductase (enzyme ci-après abrégée DHFR). Le plasmide est transfété dans les cellules animales, par exemple les cellules CHO 35 DHFR⁻ (incapables d'exprimer la DHFR). Une lignée est sélectionnée pour sa résistance au méthotréxate : elle a intégré dans son génome

un nombre élevé de copies du gène recombinant et exprime ce dernier à un niveau suffisant.

Pour une expression dans les cellules eucaryotes telles que la levure, par exemple *Saccharomyces cerevisiae*, il convient 05 d'insérer la séquence codante entre, d'une part, des séquences reconnues comme promoteur efficace, d'autre part, un terminateur de transcription. L'ensemble promoteur-séquence codante-terminateur, appelé cassette d'expression, est cloné soit dans un vecteur plasmidique (monocopie ou polycopie pour la levure, soit intégré en 10 multicopie dans le génome de la levure.

L'invention a également trait aux cellules eucaryotes transformées par le vecteur d'expression précédent. Parmi celles-ci, on apprécie les souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, en particulier celles qui comportent une mutation sur l'un des 15 gènes responsables de la synthèse de la leucine ou de l'uracile, par exemple le gène *LEU2* ou le gène *URA3*.

L'invention a également trait aux cellules animales contenant, avec les moyens nécessaires à son expression, ce gène recombinant. Ce dernier peut, par exemple, avoir été introduit dans 20 les cellules par transfection par le vecteur d'expression ci-dessus, par infection au moyen d'un virus ou d'un rétro-virus le portant, ou par microinjection.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention d'urate oxydase recombinante qui comprend les étapes de :

25 1) mise en culture d'une souche telle que définie ci-dessus :

2) lyse de cellules ;

3) isolement et purification de l'urate oxydase recombinante contenue dans le lysat.

30 L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples ci-après :

une grande partie de l'ensemble des techniques ci-après, bien connues de l'homme de l'art, est exposée en détail dans l'ouvrage de Maniatis et al : "Molecular cloning : a laboratory 35 manual" publié en 1984 par les éditions Cold Spring Harbor Press à New York.

EXEMPLE 1 : Isolement des ARN messagers d'*Aspergillus flavus*

La souche d'*A. flavus* productrice d'urate oxydase a été cultivée dans des conditions de production d'urate oxydase, c'est-à-dire dans un milieu contenant de l'acide urique de composition suivante : glucose 15 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l, KH_2PO_4 0,75 g/l, $CaCO_3$ 1,2 g/l, acide urique 1,2 g/l, KOH 0,5 g/l, huile de soja 0,66 mL/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg/l, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1 mg/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 3 mg/l, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1 mg/l.

Le milieu est ajusté à pH 7 avec H_2SO_4 1M et est stérilisé à 120°C pendant 80 min.

Dans un erlenmeyer de 5 L on ensemence 1,5 L de milieu avec environ 1 à $3 \cdot 10^7$ spores.

La culture est incubée pendant environ 40 h à 30°C sous agitation (120 tr/min). Le mycélium est récupéré par filtration sur gaze, lavé avec de l'eau et congelé dans l'azote liquide.

15 g de mycélium (poids humide) sont décongelés et resuspendus dans 45 ml de tampon de lyse puis repris dans un même volume de billes (0,45 µm de diamètre). Le tampon de lyse est constitué de thiocyanate de guanidine 4 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 10 mM, β -mercaptoéthanol 50 mL/l. La suspension mycélienne est broyée au broyeur Zellmühle (vibrogène) pendant 5 min.

Le broyat est récupéré et les billes décantées. Le surnageant est prélevé (environ 45 mL) et ramené à 3 M final en chlorure de lithium et conservé à 0°C.

Après deux jours, on le centrifuge pendant 60 min à 10 000 tr/min. Le surnageant est écarté et le culot est repris dans 40 mL de LiCl 3M et recentrifugé à 10 000 tr/min pendant 1 h 30.

On ajoute la protéinase K (SIGMA), 40 µg/ml du SDS (0,1 % P/V) et de l'EDTA à 20 mM. On incube à 37°C pendant 3 h. On précipite avec 2 volumes d'éthanol, puis on effectue un lavage à l'éthanol 70 %. On reprend le culot dans 0,5 mL de tampon TE (tris HCl 10 mM EDTA, 1 mM pH 7,5), on extrait 2 fois au chloroforme, on précipite à l'éthanol. Les ARN sont conservés à -80°C dans l'alcool.

EXEMPLE 2 : Purification de la fraction poly A⁺ des ARN

Environ 1 mg d'ARN est précipité 20 min à 4°C (15 000 tr/min) puis lavé avec de l'éthanol 70 % puis séché.

05 Le culot est repris dans 1 ml de tampon TE et resuspendu par agitation au vortex. L'oligo dT-cellulose type 3 (commercialisé par Collaborative Research Inc, Biomedicals Product Division) est préparé suivant les recommandations du fabricant. L'ARN est déposé sur l'oligo dT, agité doucement pour remettre en suspension les billes, puis chauffé pendant 1 min à 65°C.

10 La suspension est ajustée à 0,5 M NaCl puis mise à agiter doucement pendant 10 min. La suspension est alors centrifugée pendant 1 min à 1 000 tr/min, le surnageant est éliminé, le culot est lavé 2 fois avec 1 ml de tampon TE contenant 0,5 M NaCl. Les surnageants sont éliminés. L'élution de la fraction polyadénylée 15 des ARN (constituée des ARN messagers) est obtenue par suspension des billes dans 1 ml de tampon TE, puis chauffage de cette suspension à 60°C pendant 1 min, suivi d'une agitation pendant 10 min sur plaque basculante. On centrifuge ensuite 1 min à 1 000 tr/min, ce qui permet de récupérer d'une part le surnageant contenant des 20 ARNm libres en solution et d'autre part le culot de billes de cellulose. L'ensemble des opérations ci-dessus (à partir de l'élution) est répété. Les surnageants ainsi obtenus sont rassemblés, on élimine l'excès de billes par centrifugation et on précipite le surnageant à l'éthanol contenant du NaCl suivant les 25 techniques habituelles. (Maniatis : op. prec.).

EXEMPLE 3 : Constitution de la banque des ADNc

30 A partir des ARN messagers isolés comme décrit dans l'exemple précédent, on a réalisé une banque d'ADNc dans le vecteur pTZ19R (commercialisé par PHARMACIA). Ce vecteur est un plasmide comprenant un polylinker contenant des sites uniques de restriction.

35 La technique de clonage utilisée est celle décrite par Caput et al, (technique de l'amorce-adapteur (Primer-adapter) : (Caput et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) (1986) 83, 1670-1674)).

Elle consiste d'une part à digérer le vecteur par *Pst*1, ajouter une queue de polydC sur l'extrémité 3' protubérante, puis à digérer les plasmides ainsi obtenus par *Bam*HI. Le fragment correspondant au vecteur est purifié sur colonne de Sépharose CL4B (Pharmacia). Il comprend donc une queue polydC à une extrémité, l'autre extrémité étant cohésive, du type *Bam*HI. D'autre part, les ARN messagers sont soumis à la transcription inverse à partir d'une amorce dont la séquence est la suivante 5'<GATCCGGGCCCT₍₁₂₎>3. Ainsi, les ADNc présentent-ils à leur extrémité 5' la séquence 10 GATCC complémentaire de l'extrémité cohésive *Bam*HI.

Les hybrides ARN-ADN obtenus par action de la transcriptase inverse sont soumis à une hydrolyse alcaline qui permet de se débarrasser de l'ARN. Les ADNc simple brin sont alors purifiés par 2 cycles sur colonne de Sépharose CL4B et soumis à un 15 traitement à la terminal transférase de façon à ajouter des polydG en 3'. Les ADNc sont insérés sous forme simple brin dans le vecteur préparé comme décrit plus haut. Un second oligonucléotide "l'adapter" complémentaire de l'amorce est nécessaire pour générer un site *Bam*HI "ouvert" à l'extrémité 5' des ADNc. Après hybridation du vecteur, de l'ADNc et de l'"adapter", les molécules recombinantes sont circularisées par l'action de la ligase du phage T4. Les régions simple brin sont alors réparées grâce à l'ADN polymérase du phage T4. Le pool de plasmides ainsi obtenu 20 sert à transformer la souche MC 1061 pour la résistance à l'ampicilline (Casabandan Chou et Cohen J. Bact. (1980) 143 pages 25 971-980).

EXEMPLE 4 : Purification de l'urate oxydase extractive d'*A. flavus* et caractérisation de celle-ci

30 1) Purification de l'urate oxydase extractive d'*A. flavus*.

Une préparation d'urate oxydase extractive d'*A. flavus* (uricozyme - Laboratoires Clin Midy) présentant une activité urate oxydase spécifique de 8 U/ml (l'activité spécifique urate oxydase est le rapport entre l'activité urate oxydase mesurée selon le test 35 décrit à l'exemple 9 et la masse de protéines totales mesurée par la méthode de Bradford : Anal. Biochem., 72, 248-254) a été repu-

rifiée par chromatographie sur une colonne d'agarose greffé Red-agarose 120 (SIGMA), concentration par ultrafiltration et filtration sur un gel polyacrylamide-agarose Ultrogel ACA 44 (IBF), selon le protocole ci-après :

05

Etape 1 : Chromatographie d'affinité sur agarose greffé

Température : 4°C

Colonne : PHARMACIA K50/30

- diamètre = 50 mm

10

- longueur = 33 cm

Résine : Red 120 Agarose (3 000 CL/R-0503 SIGMA)

(volume de gel = 410 ml, hauteur de gel = 20 cm)

Tampon d'équilibrage : glycine/NaOH 20 mM pH 8,3

Tampon d'élution : glycine/NaOH 20 mM, NaCl 2M pH 8,3

15 Débit de mise en conditionnement : 250 ml.h⁻¹

Débit de fonctionnement : 160 ml.h⁻¹

Débit d'élution : 60 ml.h⁻¹

20 1) Déposer en tête de colonne, à l'aide d'une pompe à débit constant la solution d'Uricozyme

2) Après adsorption, laver la colonne par 2 fois son volume en tampon d'équilibrage

3) Eluer par un gradient de force ionique ayant la composition suivante :

25 glycine, NaOH, 20 mM pH 8,3/glycine, NaOH, 20 mM + NaCl 2M pH 8,3

Le volume total du gradient est égal à 10 fois le volume de la colonne, réparti pour moitié dans chacun des constituants.

L'enregistrement chromatographique est opéré à $\lambda = 280$ nm ; le

30 pool urate oxydase est collecté après regroupement des fractions présentant une activité urate oxydase spécifique supérieure ou égale à 16 U/mg.

Etape 2 : Concentration du pool urate oxydase par ultrafiltration à

35 l'aide d'un système Biopass comportant une membrane d'ultrafiltration de 10 kDa.

Etape 3 :

Température : 4°C

Colonne : PHARMACIA K 50/100

- diamètre = 50 mm

05 - longueur = 100 cm

Résine : Polyacrylamide agarose avec groupements amine et hydroxyle : l'Ultrogel ACA 44 (IBF)

- volume de gel = 1,6 l

- hauteur de gel = 80 cm

10 Tampon d'équilibrage : glycine/NaOH 20 mM pH 8,3

Débit de mise en conditionnement : 40 ml.h⁻¹Débit de fonctionnement : 24 ml.h⁻¹

15 1) Déposer en tête de colonne, à l'aide d'une pompe à débit constant, le pool urate oxydase concentré.

2) Après dépôt de l'échantillon, continuer d'alimenter la colonne avec du tampon glycine/NaOH 20 mM pH 8,3.

3) Après chromatographie, laver avec du NaCl 2M jusqu'à une valeur d'absorbance U.V. ($\lambda = 280$ nm) < 0,05.

20 Stocker sous NaCl 2 M à 4°C.

L'enregistrement chromatographique est opéré à $\lambda = 280$ nm ; le pool urate oxydase est collecté après regroupement des fractions présentant conjointement :

25 - une activité urate oxydase spécifique supérieure ou égale à 20 U/mg.

- 2 bandes seulement en électrophorèse dans des conditions dénaturantes (présence de S.D.S) et révélation au nitrate d'argent (kit de coloration Biorad), avec :

30 . une bande majeure de 33-34 kDa

. une bande mineure de 70-71 kDa

2) Caractérisation de l'urate oxydase extractive d'A. flavus purifiée :

a) séquençage partiel

35 Afin d'obtenir des informations sur la séquence des acides aminés de l'urate oxydase extractive purifiée, permettant la

synthèse des sondes nécessaires au clonage de l'ADNc, un séquençage amino-terminal direct de la protéine a été tenté. Ce dernier n'a pas abouti, à cause d'un blocage amino-terminal de la protéine (cf. f) ci-dessous).

05 La stratégie ci-après a donc été développée pour l'obtention de la séquence partielle de l'urate oxydase :

- coupure de la protéine par des enzymes protéolytiques (à l'aide des enzymes trypsine et protéase V8 de *Staphylococcus aureus*)
- séparation des polypeptides obtenus par HPLC phase inverse
- 10 - séquençage des peptides purifiés.

α) Hydrolyse de l'urate oxydase par la trypsine, purification et séquençage des peptides :

15 L'urate oxydase à 9 mg/ml dans un tampon de carbonate d'ammonium 100 mM pH 8,9 a été digérée par la trypsine (Worthington, TPCK) avec un rapport urate oxydase/trypsine de 30/1 en poids à 30°C pendant 24 h. Après l'hydrolyse tryptique, 60 µg d'urate oxydase digérée ont été directement injectés sur une colonne HPLC phase inverse de silice greffée Brownlee G18 (colonne 10 x 0,2 cm), équilibrée en acétonitrile 1 % (v/v), acide trifluoroacétique 0,1 % (v/v) dans l'eau. Les peptides ont été ensuite élués par un gradient linéaire d'acétonitrile dans une solution d'acide trifluoroacétique (0,1 % v/v) dans l'eau variant de 1 % à 60 % d'acétonitrile en 60 min, avec un débit de 150 µL/min. Les peptides 20 à la sortie de la colonne ont été détectés par mesure de la densité optique à 218 nm.

25

Le profil d'élution est présenté dans la figure 1, dans laquelle les numéros suivant la lettre T (Trypsine) correspondent aux pics identifiés.

30 Chaque pic a été collecté et conservé à -20°C jusqu'au moment de l'analyse sur un séquenceur de protéines (le modèle 470 A d'Applied Biosystems), équipé d'un chromatographe (modèle 430 A d'Applied Biosystems) qui analyse en continu les dérivés phényl-thiohydantoïques formés, après chaque cycle de dégradation.

35 Le tableau (1) ci-après présente les séquences peptidiques des 9 pics identifiés.

β) Hydrolyse de l'urate oxydase par la protéase V8, purification et séquençage des peptides.

L'urate oxydase, à une concentration de 2 mg/ml dans un tampon acétate d'ammonium 100 mM pH 6,8, a été digérée par la protéase V8 de *Staphylococcus aureus* (Boehringer-Mannheim) avec un rapport urate oxydase/protéase V8 de 60/1 à 30°C pendant 72 h. 05 160 µg d'urate oxydase digérée ont ensuite été injectés sur une colonne HPLC phase inverse de silice greffée Brownlee G18 (colonne 10 x 0,2 cm) ; particules (7 x 0,03 µm) équilibrée en acetonitrile 10 1 %, acide trifluoroacétique 0,1 % (v/v) dans l'eau. Les peptides ont ensuite été élués par un gradient linéaire d'acetonitrile dans une solution d'acide trifluoroacétique dans l'eau (0,1 % (v/v)) variant de 1 % à 60 % d'acetonitrile en 60 min, avec un débit de 150 µl/ml. Les peptides à la sortie de la colonne ont été détectés 15 par mesure de la densité optique à 218 nm.

Le profil d'élution est présenté dans la figure 2, dans laquelle les numéros suivant la lettre V (protéase V8) correspondent aux pics identifiés.

Chaque pic a été collecté et conservé à -20°C jusqu'au 20 moment de l'analyse sur le séquenceur de protéines déjà mentionné.

Le tableau (1) ci-après présente les séquences peptides des 5 pics identifiés.

TABLEAU (1)

		Séquencage des produits obtenus par hydrolyse
A l'aide de la trypsine	T 17	Asn - Val - Gln - Val - Asp - Val - Val - Glu - Gly - Lys
	T 20	Asn - Phe - Tyr - Gly - Leu - Gln - Glu - Val
	T 23	Phe - Asp - Ala - Thr - Trp - Ala
	T 27	His - Tyr - Phe - Glu - Ile - Asp - Leu - Ser
	T 28	Ile - Leu - Ser - Thr - Asp - Val - Asp - Ala - Thr - Trp - Gln - Trp - Lys
	T 29	His - Tyr - Phe - Glu - Ile - Asp - Leu - Ser - Trp - His - Lys
	T 31	Ser - Thr - Asn - Ser - Gln - Phe - Trp - Gly - Phe - Leu - Arg
	T 32	Gln - Asn - Pro - Val - Thr - Pro - Pro - Glu - Leu - Phe - Gly - Ser - Ile - Leu - Gly - Thr
	T 33	Gln - Asn - Pro - Val - Thr - Pro - Pro - Glu - Leu - Phe - Gly - Ser - Ile - Leu - Gly - Thr
	V 1	Tyr - Ser - Leu - Pro - Asn - Lys - His - Tyr - Phe - Glu - Ile - Asp - Leu - Ser - Trp - His - Lys
A l'aide de la protéase V8	V 2	Val - Thr - Leu - Lys - Thr - Phe - Ala - Glu - Asp - Asn - Ser - Ala - Ser - Val - Gln - Ala
	V 3	Thr - Ser - Tyr - Thr - Lys - Ala - Asp - Asn - Ser - Val - Ile - Val - Asp - Thr - Asp - Ser - Ile - Lys - Asn - Thr - Ile - Tyr - Ile - Thr
	V 5	Gly - Lys - Gly - Ile - Asp - Ile - Lys - Ser - Ser - Leu - Ser - Gly - Leu - Thr - Val - Leu - Lys - Ser - Thr - Asn - Ser - Gln - Phe - Trp - Gly - Phe - Leu - Arg
	V 6	Gly - Lys - Gly - Ile - Asp - Ile - Lys - Ser - Ser - Leu - Ser - Gly - Leu - Thr - Val - Leu - Lys

b) Activité spécifique :

L'urate oxydase extractive purifiée présente une activité spécifique d'environ 30 U/mg.

05

c) Electrophorèse en conditions dénaturantes

10

L'électrophorèse de l'urate oxydase extractive purifiée sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodécyl-sulfate), suivie d'une révélation à l'argent, permet de voir une bande de forte intensité d'environ 33-34 kDa et une bande de très faible intensité d'environ 70-71 kDa.

d) Détermination du point isoélectrique :

15

mode opératoire :

- Utilisation des gels prêts à l'emploi, les LKB Ampholines Gel Plates de Pharmacia de gammes de pH : (3,5-9,5) et (5-8).

20

- Dépôt de 10 µl de protéines de témoins LKB (gamme des points isoélectriques des protéines témoins : 3,5-9,5) et d'urate oxydase purifiée 4 µg et 8 µg (sur deux pistes différentes).

- Run 1 h 30, 12V, 6°C.

25

- Puis coloration au bleu de Commassie (0,1 %) dans (25 % Ethanol, 8 % Acide Acétique) de façon à colorer les protéines, suivie d'une décoloration à l'aide d'une solution contenant 25 % Ethanol et 8 % Acide Acétique (pour éliminer le bruit de fond).

- Résultats : Observation sur chacune de deux pistes de deux bandes rapprochées (doublet) de points isoélectriques 8,1 et 7,9.

30

e) Analyse en gel bidimensionnel

L'analyse en gel bidimensionnel permet de séparer les protéines dans un premier temps d'après leurs points isoélectriques et dans un deuxième temps d'après leurs masses moléculaires.

Protocole

Echantillon : solution d'urate oxydase extractive purifiée dans un tampon glycine 20 mM de pH 8,3.

05

Préparation de l'échantillon

- Deux échantillons de 5 µg et 10 µg d'urate oxydase ;
- Séchage par centrifugation sous vide, reprise dans 5 µl du tampon de lyse de composition suivante :
urée 2,5 M, / 3-(3-cholamidopropyl) diméthylammonio) 1-propane sulfonate CHAPS (Sigma) / 2 % (v/v), / Amphotères Ampholines (LKB) de gamme de pH 5-8 et 3,5-9,5 / 0,4 % et β mercaptoéthanol 5 %.

15

Gel d'isoélectrofocalisation

- Préparation d'une solution contenant : urée 9,5 M, CHAPS 5 %, Ampholines LKB (pH (3,5-9,5) 1 % ; pH (5-8) 1 %), Acrylamide/bisacrylamide (28,4 %/1,7 %) 3,5 % final, H_2O .
- Solution filtrée et dégazée puis addition de 0,075 % de tétraméthyléthylène diamine Temed (Pharmacia) et de 0,015 % persulfate d'ammonium.
- Solution coulée dans des tubes (16 x 0,12 cm) - polymérisation une nuit à 20°C.
- Section cathodique : NaOH 0,1 M dégazée.
Solution anodique : H_3PO_4 25 mM.
- Pré run 45 min 4 mA (voltage 300 V \longrightarrow 1 000 V).
- Dépôt des échantillons au niveau de la cathode.
- Run 19 h à 1 000 V à 20°C.
- Gels démoulés et équilibrés 10 min à 20°C dans un tampon (Tris 0,375 M pH 8,8 ; SDS 3 %, Dithiothréitol DTT 50 mM).

Gel dénaturant PAGE/SDS

- 35 - Préparation d'une solution contenant : Acrylamide/bisacrylamide (30 %/0,8 %) 15 % final, tris-HCl (pH 8,8) 0,375 M, H_2O .

- Solution filtrée et dégazée puis addition de SDS (0,1 %), de per-sulfate d'ammonium 0,05 % et de Temed 0,05 %.
- Polymérisation une nuit à 4°C (gel 16 x 20 x 0,15 cm).
- Le gel d'isoélectrofocalisation après équilibration est déposé à 05 la surface du gel PAGE/SDS qui scellé par de l'agarose.
- Tampon d'électrophorèse : (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glycine 0,192 M, SDS 0,1 %).
- Run 100 mA - 6 h à 6°C.
- Gel fixé dans 50 % de méthanol, 10 % acide acétique puis coloré 10 au nitrate d'argent (Méthode de Blum. H., Electrophoresis 1987, 8 p. 93-99).
- Gel scanné sur un analyseur d'image visage 2000/Kodak pour déterminer la densité optique et la surface de chaque spot, donc permettre de calculer le rapport quantitatif entre les spots.
- 15 - La masse molaire de la protéine est déterminée en réalisant un gel bidimensionnel en présence de protéines témoins Amersham.

Résultat :

20 On observe deux spots de masse moléculaire voisine de 33,5 kDa, l'un majoritaire de point isoélectrique voisin de 8,0 d'intensité 5,2 (représentant environ 93 % de la masse protéique), l'autre minoritaire de point isoélectrique voisin de 7,4 d'intensité 0,41 (représentant environ 7 % de la masse protéique).

25 f) Détermination de la séquence amino-terminale et de la masse du groupement amino-terminal bloquant :

α) mise en évidence du caractère bloqué de la séquence amino-terminale :

30 La séquence amino-terminale a été analysée à l'aide d'un séquenceur Applied Biosystem modèle 470 A, couplé à un analyseur de dérivés phénylthiohydantoïques Applied Biosystem modèle 120A. L'urate oxydase purifiée (200 pmoles contrôlées par analyse d'acides aminés) a été déposée sur le séquenceur en présence de 35 20 pmoles de β -lactoglobuline, protéine témoin.

Aucune séquence amino-terminale correspondant à une séquence de l'urate oxydase n'a été détectée (par contre la séquence amino-terminale de la protéine témoin a été détectée, donc le séquenceur fonctionne).

05 L'urate oxydase d'*A. flavus* a donc l'extrémité amino-terminale bloquée.

10 b) détermination de la séquence d'un peptide amino-terminal de 32 acides aminés et de la masse du groupement amino-terminal bloquant :

Méthode : Digestion par le bromure de cyanogène

15 L'urate oxydase extractive purifiée est soumise à un gel filtration sur un gel obtenu par réticulation du dextran avec de l'épichlorhydrine, le Sephadex G25 (PD10 - Pharmacia), équilibré avec une solution contenant 7 % d'acide formique, ce qui permet d'éliminer les sels et de changer le tampon. Par centrifugation sous vide, la concentration en acide formique est augmentée à 70 %.

20 On ajoute alors du bromure de cyanogène à 0,2 M final et on laisse réagir 20 h sous argon, en absence de lumière, et à température ambiante.

25 - Séparation par chromatographie d'échanges d'ions des peptides issus de la digestion au bromure de cyanogène de la protéine

Les peptides ont été séparés sur une colonne d'échanges d'ions à base de résine hydrophile mono S (Pharmacia).

Tampon A : Acétate d'ammonium 10 mM pH 6,2

30 Tampon B : Acétate d'ammonium 1 M pH 6,2

Débit : 0,6 mL/min, détection des pics par mesure de la densité optique à 278 nm

Gradients : à 0 % de B à 100 % B en 30 min - collecte de fractions de 1 mL.

Les fractions issues de l'étape d'échanges d'ions ont été analysées par gel PAGE/SDS suivant la méthode décrite par Schagger et Von Jagow (1987) Anal. Biochem 166 - p. 368-379.

05 - Purification du peptide amino-terminal par HPLC phase inverse et analyse par spectrométrie de masse de ce dernier

Le peptide issu de l'étape d'échanges d'ions et ayant une masse molaire voisine de 4 000 Da (sur gel PAGE/SDS) a été purifié sur 10 une colonne d'HPLC phase inverse à base de silice greffée C18, la colonne Beckman Altex C18 (250 x 2,1 mm)

Débit : 0,3 mL/min, détection des pics par mesure de la densité optique à 218 nm

15 Tampon A : H₂O/0,1 % TFA (acide trifluoroacétique)
Tampon B : Acétonitrile/0,1 % TFA

Gradient de 1 à 50 % de B en 60 min.

Le peptide collecté après une première étape d'HPLC phase inverse a été repurifié sur la même colonne d'HPLC phase inverse mais avec un 20 gradient différent.

Gradient de 1 à 50 % de B en 10 min.

Le pic collecté a été soumis à une analyse par spectrométrie de masse à bombardement par atomes rapides (FAB/MS) avec une matrice glycérol + thioglycérol.

25 - Digestion par la chymotrypsine du peptide amino-terminal et analyse des acides aminés des peptides chymotryptiques séparés par HPLC phase inverse

30 Afin d'établir la séquence du peptide purifié par HPLC phase inverse, celui-ci a été digéré par la chymotrypsine. Les peptides chymotryptiques ont été séparés par HPLC phase inverse sur colonne Beckman Altex C18 (250 x 2,1 mm).

Débit 0,3 mL/min, détection des pics par mesure de la densité 35 optique à 218 nm,

Tampon A $H_2O/0,11\% TFA$

Tampon B Acétonitrile/0,08 % TFA

Gradient de 1 % de B à 50 % B en 60 min - collecte des pics.

05 Les peptides chymotryptiques ont été identifiés par analyse d'acides aminés sur Analyseur Applied Biosystem (modèle 420-130A).

Résultats :

10 Les résultats présentés ci-après, établis postérieurement à la détermination de la séquence de l'ADNc de l'urate oxydase d'A. flavus et de la séquence d'acides aminés déduite (Cf. exemple 6), ne peuvent être compris qu'à la lumière de ceux-ci.

15 - Analyse par spectrométrie de masse du peptide amino-terminal.

On observe une différence d'environ 42 unités de masse atomique entre les deux masses moléculaires déterminées par spectrométrie de masse, 3684 et 3666, et les masses moléculaires théoriques déterminées à partir de la séquence suivante (séquence d'acides aminés déduite de l'ADNc de l'urate oxydase d'A. flavus avec clivage du groupe méthionine amino-terminal et coupure peptidique par le bromure de cyanogène après le premier résidu méthionine) :

25

Ser Ala Val Lys Ala Ala Arg Tyr Gly Lys Asp Asn Val Arg Val Tyr
Lys Val His Lys Asp Glu Lys Thr Gly Val Gln Thr Val Tyr Gly (1)

30 avec un résidu méthionine carboxyterminal modifié par action du bromure de cyanogène soit en homosérine, 3642, soit en homosérine lactone, 3624.

Il y a donc un groupement bloquant sur la sérine amino-terminale qui confère une masse supplémentaire d'environ 42 unités

de masse atomique, correspondant probablement à une acétylation de ce dernier (masse de CH_3CO -masse H = 42 unités de masse atomique).

- Analyse des acides aminés des peptides chymotryptiques:

05

Cette analyse a permis de montrer dans ambiguïté que la séquence du peptide amino-terminal obtenu par digestion au bromure de cyanogène comprend la séquence (1), explicitée ci-dessus.

10 La séquence complète d'acides aminés de l'urate oxydase est indiquée ci-après :

Ser Ala Val Lys Ala Ala Arg Tyr Gly Lys Asp Asn Val Arg Val Tyr Lys
Val His Lys Asp Glu Lys Thr Gly Val Gln Thr Val Tyr Glu Met Thr Val
Cys Val Leu Leu Glu Gly Glu Ile Glu Thr Ser Tyr Thr Lys Ala Asp Asn
15 Ser Val Ile Val Ala Thr Asp Ser Ile Lys Asn Thr Ile Tyr Ile Thr Ala
Lys Gln Asn Pro Val Thr Pro Pro Glu Leu Phe Gly Ser Ile Leu Gly Thr
His Phe Ile Glu Lys Tyr Asn His Ile His Ala Ala His Val Asn Ile Val
Cys His Arg Trp Thr Arg Met Asp Ile Asp Gly Lys Pro His Pro His Ser
Phe Ile Arg Asp Ser Glu Glu Lys Arg Asn Val Gln Val Asp Val Val Glu
20 Gly Lys Gly Ile Asp Ile Lys Ser Ser Leu Ser Gly Leu Thr Val Leu Lys
Ser Thr Asn Ser Gln Phe Trp Gly Phe Leu Arg Asp Glu Tyr Thr Thr Leu
Lys Glu Thr Trp Asp Arg Ile Leu Ser Thr Asp Val Asp Ala Thr Trp Gln
Trp Lys Asn Phe Ser Gly Leu Gln Glu Val Arg Ser His Val Pro Lys Phe
Asp Ala Thr Trp Ala Thr Ala Arg Glu Val Thr Leu Lys Thr Phe Ala Glu
25 Asp Asn Ser Ala Ser Val Gln Ala Thr Met Tyr Lys Met Ala Glu Gln Ile
Leu Ala Arg Gln Gln Leu Ile Glu Thr Val Glu Tyr Ser Leu Pro Asn Lys
His Tyr Phe Glu Ile Asp Leu Ser Trp His Lys Gly Leu Gln Asn Thr Gly
Lys Asn Ala Glu Val Phe Ala Pro Gln Ser Asp Pro Asn Gly Leu Ile Lys
Cys Thr Val Gly Arg Ser Ser Leu Lys Ser Lys Leu

EXEMPLE 5 : Criblage des bactéries

1) Préparation des sondes marquées

Deux pools de sondes déduites de séquences en aminoacides de la protéine ont été synthétisés à l'aide d'un synthétiseur d'ADN Biosearch 4600. Le premier pool correspond à la séquence de résidus His-Tyr-Phe-Glu-Ile-Asp (partie de la séquence de T 27), soit de 5' vers 3' :

10	A	T	G	G	G
	T C G A T	T C	A A	T A	T G
	T	C	A	A	A

Ce pool est en fait constitué de $2^4 \times 3 = 48$ oligonucléotides différents représentant toutes les combinaisons possibles.

15 Le deuxième pool correspond à la séquence en résidus aminoacides Gln-Phe-Trp-Gly-Phe-Leu (partie de la séquence de V5), soit de 5' vers 3' :

Ce pool est constitué de $2^4 \times 4 = 64$ combinaisons.

25 Les sondes sont marquées à la terminale désoxynucléotide transférase (TdT) (commercialisé par IBI, Inc).

La réaction s'effectue sur 100 ng d'un mélange d'oligo-nucléotides en solution (100 mg/ml) dans du tampon de réaction "Cobalt" (fourni 10 fois concentrée par IBI inc. : 1,4 M de cocodylate de potassium-pH 7,2, 300 mM de dithiothréitol, 1 µl d'enzyme désoxynucléotidyl-terminal-transférase (IBI inc) et 50 µCi de désoxycytidyltriphosphate dCTP marqué au P32.

La réaction se fait à 37°C pendant 10 min puis est arrêtée en ajoutant 1 µl d'EDTA 0,5 M.

35 On extrait au phénol et on dialyse sur colonne de polyacrylamide Bio gel P 10 (Biorad : 150-1050)

2) Hybridation et détection des colonies contenant l'ADNc de l'urate oxydase :

Environ 40 000 colonies sont ciblées par la technique d'hybridation *in situ* mise au point par Grunstein et Hogness (1975, 05 Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 72 3961). Environ 6 000 bactéries sont étalées sur boîtes de Pétri de façon à obtenir des colonies isolées. Après incubation pendant 24 h à 37°C, chaque boîte est repliquée sur 2 filtres, chaque filtre étant destiné à être traité avec un des 2 pools de sondes, de façon que toutes les colonies 10 obtenues soient testées avec les 2 pools de sondes en parallèle.

Les filtres sont mis à hybrider avec un des 2 pools de sondes dans un tampon contenant 6 x SSC, 10 x Denhardt's et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé (SIGMA). La température d'hybridation est de 42°C et la durée de 16 h. La solution 15 6 x SSC s'obtient par dilution d'une solution 20 x SSC. La préparation du tampon 20 x SSC est décrite dans Maniatis, Fritsch et Sambrook (op. cité). En résumé, ce tampon contient 175,3 g/l de NaCl ; 88,2 g/l de citrate de sodium et est ajusté à pH 7 par quelques gouttes de NaOH 10N. La solution 10 x Denhardt's contient 20 1 g de Ficoll, 1 g de polyvinylpyrrolidone, 1 g de sérum-albumine humaine pour 500 ml de volume final.

Après lavage dans la solution 6 x SSC à 42°C (3 h avec 5 changements de bain), les filtres sont essuyés au papier Joseph et mis en autoradiographie. Les filtres sont révélés après 16 h. Il 25 est apparu qu'une fraction d'environ 0,5 % des colonies hybridait avec les 2 pools de sondes.

5 colonies parmi celle-ci ont été reprises et purifiées. On a préparé l'ADN plasmidique de chacune de ces colonies, et l'on a analysé cet ADN par digestion avec soit BamHI, soit HindIII, soit 30 à la fois BamHI et HindIII.

Après analyse sur gel d'agarose, il est apparu que les 5 plasmides obtenus sont linéarisés par BamHI et par HindIII. Les doubles digestions permettent de libérer un fragment correspondant à l'intégralité de l'ADNc cloné. La taille de ce fragment est 35 d'environ 1,2 Kb dans 3 cas, d'environ 0,9 Kb dans les 2 autres cas. Pour la détermination ci-après on a sélectionné un des

fragments de 0,9 Kb et un des fragments de 1,2 Kb qui ont été réclonés (voir exemple 6 ci-après).

EXEMPLE 6 : Détermination de la séquence de l'ADNc de l'urate oxydase

05 On a recloné un des fragments de 0,9 Kb d'une part (clone 9A) et un des fragments de 1,2 Kb (clone 9C) d'autre part, dans l'ADN de la forme replicative de phage simple-brin M13. L'ADN des clones M13 contenant d'une part le fragment de 0,9 Kb et d'autre part le fragment de 1,2 Kb a été soumis à une digestion exonuclease classique de manière à générer une série de clones M13 chevauchants (procédure "Cyclone I Biosystem" de IBI). Ces derniers ont été séquencés par la méthode des didéoxyribonucléotides (Sanger et al, PNAS-U.S.A.-1977, 74, 5463-5467).

15 La séquence nucléotidique du clone 9C est représentée sur la figure 3 laquelle indique également par une flèche le début du clone 9A et par un symbole nucléotidique muni d'un astérisque * les nucléotides séquencés du clone 9A non identiques à ceux du clone 9C (quand on fait correspondre les deux séquences et les sites de restriction AccI et BamHI utilisés dans les constructions ultérieures 20 (cf. exemple 10)).

On constate que :

25 - la séquence nucléotidique du fragment le plus long (clone 9C) recouvre celle du fragment le plus court (clone 9A), à deux différences près (v figure 3). Une des différences est silencieuse, l'autre correspond à un changement d'un résidu tryptophane en résidu glycine. Ces différences peuvent être dues, soit à des différences dans les ARN messagers isolés, (Cf. exemple 2 ci-dessus), soit à des erreurs de la transcriptase inverse utilisée lors de la constitution de la banque des ADNc (Cf. exemple 3 ci-dessus). Le séquençage de l'ADN génomique, de l'urate oxydase d'A. flavus a permis de lever cette ambiguïté : il s'agit d'un résidu tryptophane (et donc probablement d'une erreur de la transcriptase inverse).

30 Dans le cas du fragment le plus long, un codon ATG (en position 109 sur la figure 3) ouvre une phase ouverte correspondant à un polypeptide de 302 aminoacides, de masse moléculaire voisine

de 34240 Da, dont la séquence correspond à la séquence partielle de l'urate oxydase d'*A. flavus* purifiée (Cf. exemple 4).

On a représenté sur la figure 4 la séquence d'ADN ouverte par le codon ATG et le polypeptide codé, ainsi que par des flèches en vis-à-vis avec le polypeptide codé les peptides séquencés (Cf. exemple 4) obtenus par hydrolyse de l'urate oxydase d'*A. flavus* à l'aide de la trypsine et de la protéase V8.

On constate que la séquence du polypeptide se termine par le triplet Ser-Lys-Leu, typique des enzymes à localisation peroxy-
10 somale (Gould S.J. et al, J. Cell, Biology 108 (1989) 1657-1664).

EXEMPLE 7 : Construction d'un vecteur d'expression de l'ADNc de l'urate oxydase

On a préparé le plasmide p466, vecteur d'expression dans *E. coli*. Ce dernier comprend un fragment de pBR327 incluant l'origine de réplication et le gène de résistance à l'ampicilline, il comprend également un promoteur synthétique d'*E. coli* (R. RODRIGUEZ et M. CHAMBERLIN "Promoters-Structure and function (1982) Preager"), une séquence de Shine-Dalgarno, suivie d'un polylinker présentant les sites uniques *NdeI* et *KpnI*, un terminateur de transcription (dérivé du phage *fd*) et le gène *lac i*.

Ce plasmide a été construit à partir d'un plasmide d'expression de l'hGH dans *E. coli* (p462) par substitution d'un fragment portant le gène de l'hGH par l'ADNc de l'urate oxydase.

La construction du plasmide p466 va maintenant être décrise plus en détail dans l'exposé ci-après dans lequel il sera fait référence aux figures 5, 6, 7, 8, 9.

La figure 5 représente une carte de restriction du plasmide p163,1. Les différents segments de restriction sont marqués de manière arbitraire selon la légende ci-dessous :

30

— — — — = Segment d'ADN issu du plasmide pBR322

35

—  — = Localisation de l'origine de réplication (ORI)

= Segment d'ADN contenant la séquence codant pour un précurseur naturel de l'hGH

05

 = Segment d'ADN du phage fd contenant un terminateur de transcription

10

 = Segment d'ADN contenant un promoteur-opérateur hybride tryptophane-lactose UV5

15

La figure 6 représente la carte de restriction d'un plasmide p160 dont les fragments PvulI-XholI-BamHI(1) et PvulI-ORI-BamHI(2) proviennent respectivement des plasmides p163,1 et pBR327 et dont le petit fragment BamHI(2)-BamHI(1) est le fragment 3 décrit ci-après.

20

La figure 7 représente la carte de restriction du plasmide p373,2. Les différents segments de restriction sont marqués de manière arbitraire selon la légende ci-dessous :

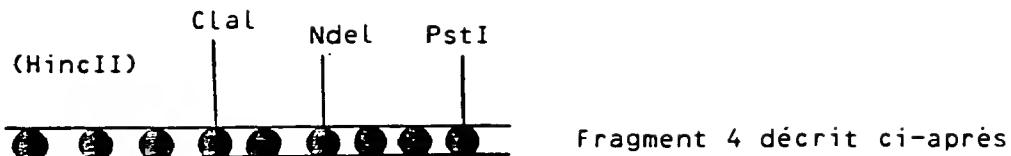
25

 + - + - + = Séquence PvulI-BamHI issue du plasmide pBR327

 - - - - - = Séquence PvulI-XholI issue du plasmide p163,1

30

 / / / / / / / = Séquence XholI-HincII issue du plasmide p163,1



05

XX XXXX = Fragment 3 décrit ci-après

10

..... = Segment d'ADN du phage fd contenant un terminateur de transcription

15

La figure 8 représente une carte de restriction du plasmide p462, le fragment synthétique BglII-HindIII défini ci-après étant représenté par :

20

La figure 9 représente une carte de restriction du plasmide p466, le fragment NdeI-KpnI comprenant le gène codant pour l'urate oxydase étant représenté par :

1) Construction du plasmide p373,2

La stratégie mise en oeuvre fait appel à des fragments obtenus à partir de plasmides préexistants accessibles au public et à des fragments préparés par voie de synthèse selon les techniques maintenant couramment utilisées. Les techniques de clonage employées sont celles décrites par T. MANIATIS EF, FRITSCH et J. SAMBROOK, Cold Spring Harbor Laboratory (1982). La synthèse des oligonucléotides est réalisée à l'aide d'un synthétiseur d'ADN Biosearch 4 600.

On a soumis le plasmide p163,1 (figure 5), décrit dans la demande de brevet EP-A-0245138 et déposée à la CNCM sous la référence I-530 le 17 février 1986, à une digestion par les enzymes PvuI et BamHI. Ce plasmide contient le gène codant pour l'hGH. Le fragment PvuI-BamHI - ci-après fragment 1 - contenant le site

d'action de l'enzyme de restriction *Xho*I, représenté sur la figure 5, a été purifié.

De même, on a soumis le plasmide pBR327, bien connu de l'homme de l'art, (cf. SOBERON, X et al., *Gene*, 9 (1980) 287-305) à une digestion par les enzymes *Pvu*I et *Bam*HI. Le fragment *Pvu*I-*Bam*HI - ci-après fragment 2 -, contenant l'origine de réplication, a été purifié.

Puis on a préparé le fragment 3, qui est un fragment synthétique *Bam*HI(1)-*Bam*HI(2) contenant le gène *lac i* et son promoteur dont la séquence est la suivante sur laquelle les deux extrémités du brin sont repérées par les nombres 1 et 2 pour préciser l'orientation du fragment dans les plasmides décrits aux figures 6 et 7.

15

FRAGMENT 3

BamHI(1)

5' GATCC GCGGAAGCAT AAAGTGTAAA GCCTGGGTG CCTAATGAGT
20 GAGCTAACTT ACATTAATTG CGTTGCGCTC ACTGCCGCT TTCCAGTCGG
GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAATGAA TCGGCCAACG CGCGGGGAGA
GGCGGTTTGC GTATTGGCG CCAGGGTGGT TTTTCTTTTC ACCAGTGAGA
CGGGCAACAG CTGATTGCCC TTCACCGCCT GGCCCTGAGA GAGTTGCAGC
AAGCGGTCCA CGCTGGTTTG CCCCACCAACC CGAAAATCCT GTTGATGGT
25 GGTAAACGGC GGGATATAAC ATGAGCTGTC TTCGGTATCG TCGTATCCCA
CTACCGAGAT ATCCGCACCA ACGCGCAGCC CGGACTCGGT AATGGCGCGC
ATTGCGCCCA GCGCCATCTG ATCGTTGGCA ACCAGCATCG CAGTGGGAAC
GATGCCCTCA TTCAGCATT GCATGGTTTG TTGAAAACCG GACATGGCAC
TCCAGTCGCC TTCCCCTTCC GCTATCGGCT GAATTTGATT GCGAGTGAGA
30 TATTTATGCC AGCCAGCCAG ACGCAGACGC GCCGAGACAG AACTTAATGG
GCCCGCTAAC AGCGCGATTT GCTGGTGACC CAATGCGACC AGATGCTCCA
CGCCCCAGTCG CGTACCGTCT TCATGGGAGA AAATAATACT GTTGATGGGT
GTCTGGTCAG AGACATCAAG AAATAACGCC GGAACATTAG TGCAGGCAGC
TTCCACAGCA ATGGCATCCT GGTCACTCAG CGGATAAGTTA ATGATCAGCC
35 CACTGACGCG TTGCGCGAGA AGATTGTGCA CCGCCGCTTT ACAGGCTTCG
ACGCCGCTTC GTTCTACCAT CGACACCACC ACGCTGGCAC CCAGTTGATC

GGCGCGAGAT TTAATCGCCG CGACAATTG CGACGGCGCG TGCAGGGCCA
 GACTGGAGGT GGCAACGCCA ATCAGCAACG ACTGTTGCC CGCCAGTTGT
 TGTGCCACGC GGTTGGGAAT GTAATTCAAGC TCCGCCATCG CCGCTTCCAC
 TTTTCCCAGC GTTTCGCAG AAACGTGGCT GGCCTGGTTC ACCACGCAGGG
 05 AAACGGCTTG ATAACAGACA CGGGCATACT CTGCGACATC GTATAACGTT
 ACTGGTTTCA CATTCAACCAC CCTGAATTGA CTCTCTTCCG GGCCTATCA
 TGCCATACCG CGAAAGGTTT TGCGCCATTG GATGGTGTCC G 3'
 BamHI(2)

10 Les fragments 1, 2 et 3 ont été alors ligués de manière à obtenir le plasmide p160 représenté sur la figure 6.

15 Ce plasmide a été soumis à une digestion partielle par les enzymes de restriction HincII et PstI. Le grand fragment HincII-PstI, contenant l'origine de réplication et représenté sur la figure 6, a été ensuite ligué au fragment 4, représenté ci-après, qui est un fragment synthétique d'ADN portant une séquence codant pour les 44 premiers acides aminés d'un précurseur naturel de l'hGH et en amont de cette séquence des signaux de régulation.

20

FRAGMENT 4

25

5' TCGAGCTGACTGACCTGTTGCTTATATTACATCGA ^{Clai}

AGCTCGACTGACTGGACAAACGAATATAATGTAGCT

30

TAGCGTATAATGTGTTGGAAATTGTGAGCGATAACAATTCACACAGTTAACTTAAGAAGGAGATACAT ^{NdeI}

ATCGATATTACACACCTAACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGTCAAATTGAAATTCTTCTCTATATGTA

35

ATG GCT ACC GGA TCC CGG ACT AGT CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGC CTG

TAC CGA TGG CCT AGG GCC TGA TCA GAC GAG GAC CGA AAA CCG GAC GAC ACG GAC

M A T G S R T S L L L A F G L L C L

XbaI

CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCT AGA CTT TTT

05

GGG ACC GAA GTT CTC CCG TCA CGG AAG GGT TGG TAA GGG AAT AGA TCT GAA AAA
P W L Q E G S A F P T I P L S R L F
-1 1

10

GAC AAC GCT ATG CTC CGC GCC CAT CGT CTG CAC CAG CTG GCC TTT GAC ACC TAC
CTG TTG CGA TAC GAG GCG CGG GTA GCA GAC GTG GTC GAC CGG AAA CTG TGG ATC
D N A M L R A H R L H Q L A F L T Y

PstI

15

CAG GAG TTT GAA GAA GCC TAT ATC CCA AAG GAA CAG AAG TAT TCA TTC CTG CA
GTC CTC AAA CTT CTT CGG ATA TAG GGT TTC CTT GTC TTC ATA AGT AAG G
Q E F E E A Y I P K E Q K Y S F

44

20

Dans ce fragment, les acides aminés sont désignés par des
lettres selon le code suivant :

25

30

A = Alanine	M = Méthionine
C = Cystéine	N = Asparagine
D = Acide aspartique	P = Proline
E = Acide glutamique	Q = Glutamine
F = Phénylalanine	R = Arginine
G = Glycine	S = Sérine
H = Histidine	T = Thréonine
I = Isoleucine	V = Valine
K = Lysine	W = Tryptophane
L = Leucine	Y = Tyrosine

35

Sont successivement soulignées dans ce fragment les
séquences -35 (TTGCTT) et -10 (TATAAT) de la séquence promotrice,
et la séquence de Shine et Dalgarno bien connue de l'homme de
l'art.

Le plasmide p380,1 a été ainsi obtenu.

Le plasmide p380,1 a été ensuite soumis à une digestion par les enzymes de restriction *Cla*I et *Nde*I de manière à en éliminer le petit fragment *Cla*I-*Nde*I du fragment 4 ci-dessus et à 05 lui substituer le fragment *Cla*I-*Nde*I ci-après :

*Cla*I

5' CGATAGCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACA
TATCGCATATTACACACCTAACACTCGCCTATTGT

10 *Nde*I

ATTTCACACAGTTTTCGCGAAGAAGGAGATACA
TAAAGTGTGTCAAAAGCGCTTCTTCCTCTATGTAT 5'

15 Le plasmide résultant est le plasmide p373,2 (figure 7).

2) Construction du plasmide p466 :

Le plasmide p373,2 a été soumis à une double digestion par les enzymes *Bgl*II et *Hind*III. Le grand fragment issu de cette digestion a été purifié et ligué avec un fragment d'ADN synthétique, dont la séquence donnée ci-après est destinée à reconstituer la fin du gène de l'hGH suivie en 3' des sites de clonage *Kpn*I et 20 *Sna*BI.

B

25 g

l

I

I

30 GATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAAACTCACACACGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGTTCGTCTGGATGTCGTTCAAGCTGTGTTGAGTGTGTTGCTA
GACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGCGTGATGAGTTCTGATGCCCGACGAGATGACGAAGTCCTCCTGTACCTGTTCCAG

F

S

P

I

05 GAGACATTCTGCATCGCAGTGCCTGAGGGCAGCTGTGGCTTAGTAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTCTGTAAGGACGCGTAGCACGTACGGGAGACACCTCCCGTCGACACCGAAGATCATT

H

10 i
 S n
 K n d
 p a I
 n B I
 15 I I I

GGTACCCCTGCCCTACGTACCA
 -----+-----+-----
 CCATGGGACGGGATGCATGGTTCGA

20 Ce fragment comprend les extrémités cohésives BglII et HindIII. Le nouveau plasmide ainsi formé p462 (cf. Fig. 8) comprend ainsi un site KpnI et un site NdeI qui vont servir au clonage du fragment portant l'ADNc de l'urate oxydase dans le vecteur d'expression.

25 Le plasmide hybride dérivé de pTZ19R portant l'ADNc d'environ 1,2 Kb (clone 9C), de l'urate oxydase (voir exemple 3) comprend un site KpnI unique. Ce site est localisé quelques paires de bases en aval du site de clonage de l'ADNc. D'autre part l'ADNc de l'urate oxydase contient un site AccI situé à proximité de l'extrémité 5'.

30 On a donc isolé et purifié le fragment AccI-KpnI comprenant la plus grande partie de cet ADNc. D'autre part on a synthétisé deux oligonucléotides complémentaires dont la séquence donnée ci-après :

5'-TATGTCTGCGGTAAAGCAGCGCGTACGGCAAGGACAATGTTGCGT
ACAGACGCCATTTCGTCGCGGATGCCGTTCTGTTACAAGCGCAGA-5'

est destinée à reconstituer l'extrémité 5' de l'ADNc. Ce fragment
05 synthétique ainsi obtenu possède une extrémité NdeI et une autre
AccII. Le fragment et la séquence synthétique ont été ligués avec
le vecteur d'expression coupé par KpnI et par NdeI. Cette ligation
à trois fragments permet d'obtenir le vecteur d'expression nommé
10 p466, de l'urate oxydase pour E. coli (cf. figure 9). Ce plasmide a
été soumis à une série d'hydrolyses enzymatiques par des enzymes de
restriction, qui a permis de vérifier la présence des sites de
restriction attendus, en particulier ceux portés par le gène codant
pour l'urate oxydase.

15 Le plasmide p466 contient donc par construction un gène
codant pour l'urate oxydase de séquence ci-après :

ATGTCTGCGG TAAAAGCAGC GCGCTACGGC AAGGACAATG TTCGCGTCTA
CAAGGTTCAC AAGGACGAGA AGACCGGTGT CCAGACGGTG TACGAGATGA
CCGTCTGTGT GCTTCTGGAG GGTGAGATTG AGACCTCTTA CACCAAGGCC
20 GACAACAGCG TCATTGTCGC AACCGACTCC ATTAAGAACCA CCATTTACAT
CACCGCCAAG CAGAACCCCCG TTACTCCTCC CGAGCTGTTG GGCTCCATCC
TGGGCACACA CTTCATTGAG AAGTACAACC ACATCCATGC CGCTCACGTC
AACATTGTCT GCCACCGCTG GACCCGGATG GACATTGACG GCAAGCCACA
CCCTCACTCC TTCATCCCGCG ACAGCGAGGA GAAGCGGAAT GTGCAGGTGG
25 ACGTGGTCGA GGGCAAGGGC ATCGATATCA AGTCGTCTCT GTCCGGCCTG
ACCGTGCTGA AGAGCACCAA CTCGCAGTTC TGGGGCTTCC TGCCTGACGA
GTACACCCACA CTTAAGGAGA CCTGGGACCG TATCCTGAGC ACCGACGTG
ATGCCACTTG GCAGTGGAAAG AATTCAGTG GACTCCAGGA GGTCCGCTCG
CACGTGCCTA AGTTGATGC TACCTGGGCC ACTGCTCGCG AGGTCACTCT
30 GAAGACTTTT GCTGAAGATA ACAGTGCCAG CGTGCAGGCC ACTATGTACA
AGATGGCAGA GCAAATCCTG GCGCGCCAGC AGCTGATCGA GACTGTCGAG
TACTCGTTGC CTAACAAGCA CTATTCGAA ATCGACCTGA GCTGGCACAA
GGGCCTCCAA AACACCGGCA AGAACGCCGA GGTCTTCGCT CCTCAGTCGG
ACCCCAACGG TCTGATCAAG TGTACCGTCTG GCCGGTCCCTC TCTGAAGTCT
35 AAATTG.

(Les nucléotides différents des nucléotides de l'ADNc isolé d'A. flavus sont soulignés dans la séquence ci-dessus. Ces différences ont été introduites sur le fragment synthétique AccI-KpnI de façon à avoir en aval de l'ATG une séquence nucléotidique plus conforme à celles habituellement rencontrées dans un gène procaryote).

EXEMPLE 8 : Expression de l'ADNc de l'urate oxydase

La souche *E. coli* K12 RR1 (Bethesda research lab. Inc.) a été transformée pour la résistance à l'ampicilline avec le plasmide p466 et avec un plasmide témoin négatif pBR322.

Des colonies résistantes à l'ampicilline ont été obtenues dans les 2 cas.

1 colonie de chaque type a été mise en culture dans du milieu (LB + ampicilline 100 µg/ml). Après une nuit à 37°C sous agitation, les deux cultures ont été diluées 100 fois dans du milieu (LB + ampicilline 100 µg/ml). Après 1 h de culture on y ajoute de l'IPTG (Isopropyl β-DThiogalactoside) 1 mM pendant 3 h.

Immunodétection de l'urate oxydase par Western blot :

1) Mode opératoire :

On prélève du milieu de culture obtenu après 3 h d'induction à l'IPTG une fraction aliquote correspondant à 0,2 ml à D0 = 1. On centrifuge cette dernière et on élimine le surnageant. On soumet ensuite le culot à un Western blot, technique bien connue de l'homme de l'art, qui comprend les étapes suivantes :

- Solubilisation du culot par ébullition pendant 10 min dans un tampon dénommé tampon de charge constitué de Tris HCl 0,125 M pH 6,8 SDS 4 %, bleu de bromophénol 0,002 %, glycérol 20 %, β-mercaptopéthanol 10 % (selon le protocole décrit par LAEMMLI (U.K. LAEMMLI, *Nature*, 227 (1970), 680-685)),
- séparation électrophorétique des différentes protéines contenues dans le solubilisat selon le protocole décrit par LAEMMLI (U.K. LAEMMLI, *Nature*, 227 (1970), 680-685),
- transfert desdites protéines contenues dans le gel sur un filtre de nitrocellulose (selon la technique de H. TOWBIN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350-4354),

Immunodétection, réalisée selon la technique de BURNETTE (W.W. BURNETTE Ana. Biochem. 112 (1981) 195-203), elle implique successivement :

- Le rinçage du filtre de nitrocellulose pendant 10 min avec un tampon A (Tris-HCl 10 mM, NaCl 170 mM, KCl 1 mM).
- 05 • La mise en contact du filtre de nitrocellulose pendant 30 min à 37°C avec un tampon B (tampon A additionné de sérum-albumine bovine à raison de 3 g pour 100 ml).
- 10 • La mise en contact du filtre de nitrocellulose pendant 1 h à 37°C avec un immunosérum (des anticorps polyclonaux reconnaissant l'urate oxydase d'A. flavus).
- 15 • Le rinçage du filtre de nitrocellulose avec le tampon B.
- La mise en contact du filtre de nitrocellulose pendant 1 h à 37°C avec une solution de protéine G marquée à l'iode 125 à 0,1 microcurie/ml.
- Le rinçage du filtre avec le tampon A.
- Le séchage du filtre entre deux feuilles absorbantes.
- La mise en contact d'un film radiographique.
- La révélation du film.

20 2) Résultats :

On constate que la souche transformée par le plasmide p466 surproduit une protéine de poids moléculaire apparent d'environ 33 KDa qui est reconnue par les anticorps dirigés contre l'urate oxydase d'A. flavus et qui est absente dans la souche témoin.

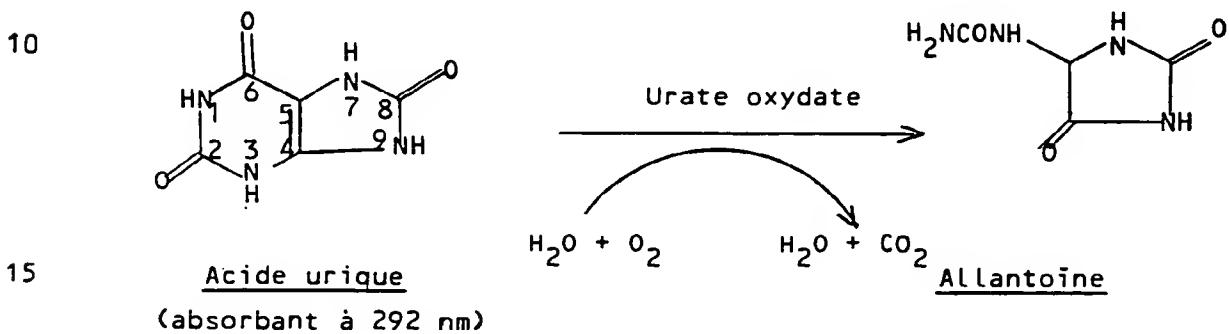
EXEMPLE 9 : Dosage de l'activité urate oxydase

On prélève du milieu de culture obtenu après 3 h d'induction à l'IPTG dans les conditions de culture décrites à l'exemple précédent une fraction aliquote correspondant à l'équivalent de 30 0,5 ml à D0 = 1. On centrifuge cette dernière et on élimine le surnageant. On reprend les culots dans 1 ml de tampon TEA (Triéthanolamine) 0,05 M pH 8,9. La suspension cellulaire est soniquée 2 fois pendant 30 s dans la glace avec un sonicateur ultrasonic W10 (réglé à puissance 8 et intensité 4). Les extraits sont centrifugés 35 à 10 000 g pendant 10 min, les surnageants sont utilisés pour le dosage.

On effectue les opérations ci-dessus pour quatre colonies prises au hasard d'*E. coli* K12 transformé par le plasmide p466 (colonies A₁, B₁, C₁ et D₁) et une colonie transformée par le plasmide pBR322).

05 1) Principe

On suit la transformation de l'acide urique en allantoïne par la diminution de l'absorbance à 292 nm. La réaction est la suivante :



20 2) Réactifs

a) Tampon TEA 0,05 M pH 8,9/EDTA

- dissoudre 7,5 g de TEA (réactif pour analyse-Prolabo réf. 287.46.266) dans 400 mL d'eau distillée,
- dissoudre 0,372 g de Complexon III (Merck-réf. 8418) dans 50 mL d'eau distillée,

- réunir les deux solutions et compléter à 500 mL (solution 1),
- ajuster le pH de cette solution à 8,9 par HCl 0,2N,
- compléter à 1 000 mL avec de l'eau distillée (solution 2).

b) Acide urique Solution stock

- dissoudre 100 mg d'acide urique (Carbiochem réf. 6671) dans 50 mL de la solution 1,
- ajuster par HCl 0,2N à pH 8,9,
- compléter à 100 mL par de l'eau distillée.

La solution obtenue peut se conserver une semaine à 4°C.

35 c) Acide urique Solution Substrat

- prélever 1,5 mL de solution stock d'acide urique (carbiochem réf.

6671) et diluer à 100 mL avec du tampon TEA/réactif pour analyse-Prolabo réf. 287.46.266).

Cette solution doit être utilisée dans la journée.

3) Mode opératoire

05 On introduit dans la cuve de quartz d'un spectrophotomètre réglé à 292 nm et thermostaté à 30°C les volumes suivants :
- 600 µl d'acide urique solution substrat (préchauffés à 30°C),
- 100 µl des surnageants ci-dessus auxquels ont été ajoutés 200 µl de TEA pH 8,9 (préchauffés à 30°C).

10 On mélange et on lit le changement de densité optique toutes les 30 s pendant 5 min. On en déduit ΔE, variation de la densité optique par minute.

4) Résultats :

15 L'activité A enzymatique urate oxydase exprimée en U/ml DO 1 est calculée à partir de la mesure de ΔE à l'aide de la formule :

$$A = \frac{\Delta E \times V_r \times d}{I \times V_{PE}}$$

20 dans laquelle les symboles V_r , d , I et V_{PE} représentent respectivement le volume réactionnel (0,9 mL), le taux de dilution (2), le coefficient d'extinction de l'acide urique à 292 nm (12,5) et le volume de la prise d'essai (0,3 mL).

25 Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau (II) ci-après :

TABLEAU (II)

	Souche d'E. coli K12 transformée par	Activité urate oxydase (U/ml DO 1)
05	pBR322	< 0,001
10	p466	0,086
		0,119
		0,135
15	colonie D ₁	0,118

IL apparaît clairement sur le tableau ci-dessus que les cellules d'E. coli transformées par le plasmide p466 sont capables en présence d'IPTG de produire une activité urate oxydase.

20 EXEMPLE 10 : Construction de trois vecteurs d'expression de l'ADNc de l'urate oxydase dans la levure, les plasmides pEMR469, pEMR473 et pEMR515

25 La stratégie mise en oeuvre fait appel à des fragments obtenus à partir de plasmides préexistants accessibles au public et à des fragments préparés par voie de synthèse selon les techniques maintenant couramment utilisées. Les techniques de clonage employées sont celles décrites par T. MANIATIS, EF. FRITSCH et J. SAMBROOK dans "Molecular Cloning, a Laboratory manual" (Cold Spring 30 Harbor Laboratory, 1984). La synthèse des oligonucléotides est réalisée à l'aide d'un synthétiseur d'ADN Biosearch 4 600.

35 La description ci-après sera mieux comprise à la lecture des figures 10, 11 et 12 qui représentent respectivement des cartes de restriction du plasmide pEMR414, et des plasmides pEMR469 ainsi que pEMR473. Les symboles utilisés sur ces figures seront précisés dans l'exposé ci-après. Dans le cas où un site a

été rendu franc par la polymérase de Kleenow, il lui est affecté l'indice "0" ; lorsque les sites ont été supprimés par ligation, ils sont indiqués entre parenthèses.

1) Construction du plasmide pEMR469 :

05 Ce plasmide a été construit à partir du vecteur navette *E. coli*-levure pEMR414, construit par ligations successives des éléments ci-après :

10 - le fragment *PstI-HindIII*⁰ - symbolisé par ++++ sur la figure
10 - du plasmide pJDB207 (BEGGS, 1978 : Gene cloning in
yeast-p. 175-203 dans : Genetic Engineering vol 2 - WILLIAMSON -
Academic Press - London UK) comprenant la partie amont du gène de
résistance à l'ampicilline *Amp*^R de pBR322 (Sutcliffe 1979 Cold
Spring Symp. Quart. Biol. 43, 779) et un fragment de 2 μ endogène
15 forme B portant le gène *LEU2* de *S. cerevisiae* partiellement déleté
de son promoteur (appelé *LEU2d*), le locus *STB* (*REP3*) et l'origine
de réplication du 2 μ (HARTLEY et DONELSON, 1980, Nature, 286,
860-865). L'extrémité *HindIII* de ce fragment a été rendue franche
20 par action de la polymérase de Kleenow. Elle est notée *HindIII*⁰ sur
la figure 10.

20 - le fragment *HindIII-SmaI* - représenté par |||| sur la
figure 10 - du chromosome V de levure contenant le gène *URA3* avec
son promoteur (ROSE et al., 1984, Gene, 29, p. 113-124). Ce
fragment *HindIII-SmaI* provient du plasmide pFL1 (CHEVALLIER et
25 al., 1980, Gene 11, 11-19). L'extrémité *HindIII* de ce plasmide a
été rendue franche par l'action de la polymérase de Kleenow.

20 - un fragment *SmaI-BamHI* - symbolisé par sur la
figure 10 - contenant une version synthétique du promoteur du gène
30 *ADH2* ne différant de la version naturelle décrite par RUSSEL et
SMITH (RUSSEL et al., 1983). J. Biol. Chem. 258, 2674-2682) que par
quelques paires de bases destinées à introduire des sites de
restriction. (La séquence naturelle pourrait être utilisée avec des
résultats peu différents). La séquence de ce fragment est donnée
ci-après :

B
 a
 m
 05 H
 GACTCTAGAG▼
 -----+
 CTGAGATCTCCTAG

10 - le fragment BgIII-HindIII - symbolisé par xxx sur la figure 10 - portant l'extrémité 3' du gène PGK de levure. Ce fragment provient de la digestion complète à l'aide de BgIII du fragment HindIII de l'ADN chromosomique de levure, portant le gène PGK décrit par HITZEMAN et al. (1982 Nucleic Acids Res., 10, 15 7791-7808) lequel ne présente qu'un site BgIII. Cette digestion permet d'obtenir deux fragments HindIII-BgIII, dont le plus petit d'environ 0,4 Kb, qui porte l'extrémité 3' du gène PGK de levure est retenu. La séquence de ce dernier fragment est décrite par HITZEMANN et al. (référence citée ci-dessus). Le site BgIII est 20 cloné dans le site BamHI du fragment précédent (les sites BamHI et BgIII disparaissent donc) et le site HindIII, rendu franc par action de la polymérase de Kleenow, est cloné dans le site PvuII du fragment PvuII-PstI de pBR322 décrit ci-après.

25 - le fragment PvuII-PstI - symbolisé par xxx sur la figure 10 - de pBR322 contenant l'origine de réPLICATION et la partie aval du gène de résistance à l'ampicilline Amp^R.

Le plasmide pEMR414 ainsi constitué comporte donc les éléments suivants :

30 - une origine de réPLICATION et un gène de résistance à l'ampicilline Amp^R permettant la réPLICATION et la sélection du plasmide dans les cellules E. coli. Ces éléments permettent la transformation dans les cellules de E. coli.

35 - une origine de réPLICATION pour la levure (ARS), le locus STB et le gène LEU2 de S. cerevisiae sans promoteur et le gène URA3 avec son promoteur de S. cerevisiae. Ces éléments permettent la réPLICATION et la sélection du plasmide dans les cellules de

S. cerevisiae ainsi qu'une efficacité de partition suffisante dans les cellules contenant le plasmide 2 μ endogène.

Le plasmide pEMR414 a été soumis à une digestion complète par les enzymes de restriction NheI et ClaI. Le petit fragment NheI-ClaI contenant le gène URA3, appelé ci-après fragment A, a été purifié.

Le plasmide pEMR414 a été soumis à une digestion complète par les enzymes NheI et BamHI. Le grand fragment NheI-BamHI contenant notamment le gène LEU2d et l'origine de réplication du plasmide pBR322, appelé ci-après fragment B, a été purifié.

On a préparé d'autre part le fragment synthétique ClaI-AccI contenant le début d'un gène codant pour la protéine déduite de la séquence de l'ADNc de l'urate oxydase (clone 9C). Ce fragment comporte des modifications par rapport au clone 9C, introduites dans le but de mettre en place des codons usuels dans la levure (Cf. SHARP et al., 1986, Nucl. Ac. Res. Vol. 14, 13, pp. 5125-5143) sans changement des acides aminés codés. La séquence de ce fragment, dénommé ci-après fragment C, est la suivante (les nucléotides soulignés sont ceux modifiés par rapport au clone 9C).

20

6

A

1

6

a

6

I

I

25

CGATATACACAATGTCTGCTGTTAAGGCTGCTAGATACGGTAAGGACAACGTTAGAGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
TATATGTGTTACAGACGGACAATTCCGACGATCTATGCCATTCTGTTGCAATCTCAGA

30

On a soumis le plasmide du clone 9C (Cf. figure 3) à une digestion par les enzymes AccI et BamHI. Le fragment AccI-BamHI qui contient la fin de l'ADNc de l'urate oxydase, ci-après appelé fragment D, a été purifié. Ce fragment a la séquence suivante :

Les fragments A, B, C et D ont été ligués de manière à obtenir le plasmide pEMR469 représenté sur la figure 11, dans laquelle les symboles ont la même signification que sur la figure 10, les nouveaux fragments *Cla*I-*Acc*I et *Acc*I-*Bam*HI étant symbolisés par [REDACTED]

2) Construction du plasmide pEMR473 :

Le plasmide pEMR469 a été soumis à une digestion complète par les enzymes *Mlu*I et *Sph*I. Le grand fragment *Mlu*I-*Sph*I contenant le gène de l'urate oxydase a ensuite été ligué au fragment synthétique, de séquence donnée ci-après, correspondant à une partie (200 pb) de la séquence en amont de l'élément TATA du promoteur GAL 7 de *S. cerevisiae*, laquelle comprend les séquences d'activation amont (upstream activation sequences : UAS).

15 M
I
U
I

CGCGTCTATACTTCGGAGCACTGTTGAGCGAAGGCTCATTAGATATATTTCTGTCA

AGATATGAAAGCCTCGTACAACTCGCTTCCGAGTAATCTATATATAAGACAGTA

20
TTTCCCTTAACCCAAAAATAAGGGAGAGGGTCCAAAAAGCGCTCGGACAACGTGTTGACCGT

AAAGGAATTGGGTTTTTATTCCTCTCCCAGGTTTTCCGCGAGCCTGTTGACAACGGCA

GATCCGAAGGACTGGCTATACAGTGTTCACAAAAATGCCAAGCTGAAAAAATGTGTAGC

CTAGGCTTCCTGACCGATAATGTCACAAAGTGTTTATCGGTTGACCTTTATTACACATCG

25 S
P
h
I

CTTAGCTATGTCAGTTAGTTGGCATG

GAAATCGATACAAAGTCAAATCAAACC

30 Le plasmide pEMR473 ainsi obtenu est représenté sur la figure 12, dans laquelle les symboles ont la même signification que dans la figure 11, le nouveau fragment *Mlu*I-*Sph*I introduit étant symbolisé par 

3) Construction du plasmide pEMR515 :

Le plasmide pEMR473 a été soumis à une digestion partielle par l'enzyme *Xba*I et à une digestion totale par l'enzyme *Mlu*I. Le grand fragment *Xba*I-*Mlu*I a été purifié. Ce fragment contient notamment les séquences de l'origine de réPLICATION et le locus STB du 2 μ , le gène LEU2d, le gène de résistance à l'ampicil-
line Amp^R, l'origine de réPLICATION du pBR322 et la cassette d'expression de l'urate oxydase. Il ne contient en revanche ni le gène URA3, ni la partie du 2 μ comprise entre les sites *Xba*I et *Nhe*I.

Le grand fragment XbaI-MluI a été recircularisé via l'adaptateur de séquence suivant comportant des extrémités cohéitives XbaI modifié et MluI :

15 XbaI modifié
▼ C T A G G C T A G C G G G C C C G C A T G C A
C G A T C G G C C C G G G C G T A C G T G C G C ▲
M L H I

20 Le plasmide pEMR515 ainsi obtenu ne possède qu'un seul des trois éléments du site FRT cible de la recombinase codée par le gène FLP du 2μ .

Les plasmides pEMR 469, pEMR473 et pEMR513 possèdent le gène codant pour l'urate oxydate de séquence ci-après :

25 ATGTCTGCTG TTAAGGCTGC TAGATACGGT AAGGACAACG TTAGAGTCTA
CAAGGTTCAC AAGGACGAGA AGACCGGTGT CCAGACGGTG TACGAGATGA
CCGTCTGTGT GCTTCTGGAG GGTGAGATTG AGACCTCTTA CACCAAGGCC
GACAACAGCG TCATTGTCGC AACCGACTCC ATTAAGAACCA CCATTACAT
30 CACCGCCAAG CAGAACCCCCG TTACTCCTCC CGAGCTGTTG GGCTCCATCC
TGGGCACACACA CTTCATTGAG AAGTACAACC ACATCCATGC CGCTCACGTC
AACATTGTCT GCCACCGCTG GACCCGGATG GACATTGACG GCAAGCCACA
CCCTCACTCC TTCATCCGCG ACAGCGAGGA GAAGCGGAAT GTGCAGGTGG
ACGTGGTCGA GGGCAAGGGC ATCGATATCA AGTCGTCTCT GTCCGGCCTG
35 ACCGTGCTGA AGAGCACCAA CTCGCAGTTC TGGGGCTTCC TGCGTGACGA
GTACACCACA CTTAAGGAGA CCTGGGACCG TATCCTGAGC ACCGACGTCG

ATGCCACTTG GCAGTGGAAAG AATTCAGTG GACTCCAGGA GGTCCGCTCG
 CACGTGCCTA AGTTCGATGC TACCTGGGCC ACTGCTCGCG AGGTCACTCT
 GAAGACTTT GCTGAAGATA ACAGTGCCAG CGTGCAGGCC ACTATGTACA
 AGATGGCAGA GCAAATCCTG GCGCGCCAGC AGCTGATCGA GACTGTCGAG
 05 TACTCGTTGC CTAACAAGCA CTATTCGAA ATCGACCTGA GCTGGCACAA
 GGGCCTCCAA AACACCGGCA AGAACGCCGA GGTCTTCGCT CCTCAGTCGG
 ACCCCAAACGG TCTGATCAAG TGTACCGTCG GCCGGTCTC TCTGAAGTCT
 AAATTG.

10 EXEMPLE 11 : Transformation de la souche de levure EMY761, par les plasmides pEMR469, pEMR473 et pEMR515 - Transformation des souches de levures EMY500 et GRF18 par le plasmide pEMR515 - Transformation avec sélection soit pour la prototrophie de l'uracile, soit pour la prototrophie de Leucine
 15

On a utilisé comme souches réceptrices trois souches de Saccharomyces cerevisiae non isogéniques :

- la souche EMY761 (Mat α , leu2, ura3, his3, gal)
- la souche EMY500 (Mat α , leu2, ura3, pep4)
- 20 - la souche GRF18 (Mat α , leu2, his3);

La souche GRF18 est bien connue de l'homme de l'art (Gerry FINK, MIT, USA). Les souches EMY761 et EMY500 sont apparentées à la souche GRF18. Elles ont été obtenues par croisements successifs de la souche GRF18 avec une souche ura3 dérivée de la souche FL100 (déposée à l'ATCC sous le n° 28 383) et avec la souche 20B12 (Mat α , tsp1, pep4) décrite par E.W. JONES (E.W. JONES et al. (1977) Genetics, 85, 23).

On peut obtenir la souche GRF18 par curage du plasmide pEMR515 de la souche GRF18 pEMR515 (leu $^+$) déposée à la CNCM sous la référence n° I-920, le 28 décembre 1989 et la souche EMY500 par curage du plasmide pEMR515 de la souche EMY500 pEMR515 (leu $^+$) déposée à la CNCM sous la référence n° I-919, le 28 décembre 1989.

35 Ces souches contiennent des mutations (Leu2 et ura3), susceptibles d'être complémentées par le marqueur de sélection défectif LEU2d et le marqueur de sélection URA3, présents dans chacun des plasmides pEMR469 et pEMR473.

1) Transformation avec sélection pour la prototrophie de l'uracile :

Une colonie de la souche EMY761 a servi àensemencer 100 ml d'un milieu appelé milieu YPG liquide (Cf. tableau III ci-après). Lors de l'obtention d'une densité cellulaire de 10^7 cellules par ml, les cellules ont été traitées à l'acétate de lithium 0,2 M pour la transformation selon une technique bien connue de l'homme de l'art, décrite par ITO et al. (ITO et al., 1983, J. Bacteriology 153, 163-168).

Les cellules EMY761 ont été transformées en parallèle avec environ 1 μ g de chacun des plasmides pEMR469 et pEMR473. Les cellules transformées sont sélectionnées pour le caractère d'auxotrophie d'uracile (ura^+) sur un milieu appelé milieu solide sans uracile, (Cf. tableau III ci-après). On a ainsi retenu un transformé EMY761 pEMR469 (ura^+) et un transformé EMY761 pEMR473 (ura^+).

2) Transformation avec sélection pour la prototrophie de leucine :

La technique de transformation utilisée est une variante de celle décrite par Beggs et al. (Beggs et al. (1978), Nature 275, 104-109). Elle consiste à soumettre les levures à un traitement de protoplastisation en présence d'un stabilisant osmotique, le sorbitol en concentration 1 M.

Le protocole précis de transformation est précisé ci-après :

a) 200 ml du milieu YPG liquide (Cf. tableau III) sont inoculés avec environ 5×10^6 cellules d'une culture en phase stationnaire et la culture ainsi inoculée est placée une nuit sous agitation à 30°C.

b) Lorsque la culture atteint environ 10^7 cellules par ml, les cellules sont centrifugées à 4 000 tr/min pendant 5 min et le culot est lavé avec du sorbitol 1 M.

c) Les cellules sont suspendues dans 5 ml de solution de sorbitol 1 M contenant 25 mM EDTA et 50 mM de dithiothréitol et incubées pendant 10 min à 30°C.

d) Les cellules sont lavées une fois avec 10 ml de sorbitol 1 M et suspendues dans 20 ml de sorbitol. De la zymolyase-100T (préparation obtenue par purification partielle sur colonne

05 d'affinité du surnageant de culture d'Arthobacter luteus et contenant de la β -1,3-glucane-laminaripentahydrolase, commercialisée par SEYKAGAKU KOGYO Co. Ltd) est ajoutée à une concentration finale de 20 μ g/ml et on incube la suspension à température ambiante pendant environ 15 min.

10 e) Les cellules sont resuspendues dans 20 ml d'un milieu contenant du sorbitol appelé milieu YPG sorbitol (Cf. tableau III ci-après) et incubées pendant 20 min à 30°C sous agitation douce.

15 f) On centrifuge pendant 3 min à 2 500 tr/min.

g) On resuspend dans 9 ml de tampon de transformation (sorbitol 1 M, tris-HCl de pH 7,5 10 mM et CaCl_2 10 mM).

h) On ajoute 0,1 ml de cellules et 5 μ l de solution d'ADN (environ 5 μ g) et on laisse la suspension obtenue pendant 10 à 15 min à température ambiante.

15 i) On ajoute 1 ml de la solution : polyéthylène glycol PEG 4000 20 %, tris-HCl de pH 7,5 10 mM et CaCl_2 10 mM.

20 j) On verse 0,1 ml de la suspension obtenue en i) dans un tube contenant du milieu solide de régénération sans leucine (Cf. tableau III ci-après) préalablement fondu et maintenu liquide à environ 45°C. On verse la suspension sur une boîte de Pétri contenant une couche solidifiée de 15 ml de milieu de régénération solide sans leucine.

25 k) On répète l'étape j) avec le reste de la suspension cellulaire obtenue en i).

Les transformés commencent à apparaître au bout de trois jours.

On a ainsi retenu les transformés EMY761 pEMR469 (leu^+), EMY761 pEMR473 (leu^+), EMY761 pEMR515 (leu^+), GRF18 pEMR515 (leu^+) et EMY500 pEMR515 (leu^+).

TABLEAU IIIPrincipaux milieux utilisés dans les exemples 11, 12, 13 et 14

05

- milieu solide sans uracile

6,7 g de base azotée de levure sans acides aminés

(Yeast nitrogen base without Amino Acids de DIFCO)

5,0 g d'hydrolysat de caséine (Casamino acids de DIFCO)

10

10 g de glucose

20 g d'agar

mélanger tous les ingrédients dans de l'eau distillée, compléter le volume final à 1 l avec de l'eau distillée. Autoclaver 15 min à 120°C.

15

- milieu liquide sans uracile

Utiliser la formule du milieu solide sans uracile en omettant l'agar - Autoclaver 15 min à 120°C.

20

- milieu solide sans leucine

6,7 g de base azotée de levure sans acides aminés

(Yeast nitrogen base without Amino Acids de DIFCO)

20 mg d'adénine

25

20 mg d'uracile

20 mg de L-tryptophane

20 mg de L-histidine

20 mg de L-arginine

20 mg de L-méthionine

30

30 mg de L-tyrosine

30 mg de L-isoleucine

30 mg de L-lysine

50 mg de L-phénylalanine

100 mg de L-acide glutamique

35

150 mg de L-valine

400 mg de L-leucine

20 g de glucose
20 g d'agar
mélanger tous les ingrédients dans l'eau distillée. Compléter le volume final à 1 l avec de l'eau distillée - Autoclaver 15 min à 120°C. Après autoclavage, ajouter 200 mg de l-thréonine et 100 mg d'acide l-aspartique.

05 - milieu solide de régénération sans leucine
10 utiliser la formule du milieu solide sans leucine en mélangeant 30 g d'agar au lieu de 20 et en ajoutant au mélange 182 g de sorbitol.

15 - milieu liquide sans leucine
utiliser la formule du milieu solide sans leucine en omettant l'agar - Autoclaver 15 min à 120°C. Après autoclavage, ajouter 200 mg de l-thréonine et 100 mg d'acide l-aspartique.

20 - milieu YP liquide
10 g d'extrait de levure (Bacto-yeast extract de DIFCO)
20 g de peptone (Bacto-peptone de DIFCO)
mélanger les ingrédients dans de l'eau distillée. Compléter le volume final à 1 l avec de l'eau distillée - Autoclaver 15 min à 120°C.

25
30 - milieu YPG liquide
utiliser la formule du milieu YP liquide auquel on ajoute, après autoclavage, du glucose à une concentration de 20 g/l.

- milieu YPG sorbitol

utiliser la formule du milieu YPG liquide auquel on ajoute, après autoclavage, du sorbitol à une concentration de 1 M.

05

- milieu YP éthanol-glycérol

utiliser la formule du milieu YP liquide. Après autoclavage, ajouter 10 ml d'éthanol 100 % (1 % final) et 30 g de glycérol.

10

- milieu YP éthanol-glycérol-galactose

utiliser la formule du milieu YP liquide. Après autoclavage, ajouter 10 ml d'éthanol 100 %, 30 g de glycérol et 30 g de galactose.

15

EXEMPLE 12 : Expression en erlenmeyer de l'ADNc de l'urate oxydase par les souches EMY761 pEMR469 (ura⁺), EMY761 pEMR473 (ura⁺), EMY761 pEMR469 (leu⁺) et EMY761 pEMR473 (leu⁺) - Immunodétection par Western Blot, dosage de l'activité urate oxydase et des protéines solubles

1) Expression de l'ADNc de l'urate oxydase :

a) Souches sélectionnées sur milieu sans uracile

Une colonie de chacune des souches EMY761 pEMR469 (ura⁺) et EMY761 pEMR473 (ura⁺) a été mise en culture dans 20 ml de milieu liquide sans uracile (Cf. tableau III, exemple 11). Après une nuit à 30°C sous agitation, les deux cultures ont été centrifugées pendant 10 min à 7 000 tr/min. Les culots ont été repris dans 10 ml d'eau distillée stérile et de nouveaux centrifugés pendant 10 min à 7 000 tr/min. L'expression de l'urate oxydase a été induite en reprenant les cellules dans 20 ml de milieu YP éthanol-glycérol (Cf. tableau III, exemple 11) pour la souche EMY761 pEMR469 (ura⁺) et 20 ml de milieu YP éthanol-glycérol-galactose (Cf. tableau III, exemple 11) pour la souche EMY761 pEMR473 (ura⁺). Les cultures ont été replacées à 30°C sous agitation pendant 22 h.

b) Souches sélectionnées sur milieu sans leucine

Dans un premier temps, une colonie de chacune des souches EMY761 pEMR469 (Leu^+) et EMY761 pEMR473 (leu^+) a été mise en culture dans 20 ml de milieu liquide sans leucine (Cf. tableau III, exemple 11). Ceci a permis d'obtenir et de maintenir un nombre de copies de plasmides élevé en pratiquant la sélection pour la complémentation de la mutation Leu2 par le gène LEU2d porté par les plasmides pEMR469 et pEMR473.

Après une nuit à 30°C sous agitation, les deux cultures ont été centrifugées pendant 10 min à 7 000 tr/min. Les culots ont été repris dans 10 ml d'eau distillée stérile et de nouveau centrifugés pendant 10 min à 7 000 tr/min. L'expression de l'urate oxydase a été induite en reprenant les cellules dans 20 ml de milieu YP éthanol-glycérol pour la souche EMY761 pEMR469 (Leu^+) et 20 ml de milieu YP éthanol-glycérol-galactose (Cf. tableau III, exemple 11) pour la souche EMY761 pEMR473 (leu^+). Les cultures ont été replacées à 30°C sous agitation pendant 22 h.

c) Souche témoin

La souche EMY761 non transformée, c'est-à-dire sans plasmide, a été cultivée comme ci-dessus. Elle a subi d'une part l'induction dans 10 ml de milieu liquide YP éthanol-glycérol et, d'autre part, l'induction dans 10 ml de milieu YP éthanol-glycérol-galactose.

2) Préparation des échantillons :

a) Les cellules cultivées en 1a), 1b) et 1c) ont été centrifugées et le surnageant a été éliminé. Les culots ont été repris dans 10 ml d'eau distillée et centrifugés pendant 10 min à 7 000 tr/min. Les culots ainsi lavés ont été repris dans environ 1 ml de tampon de triéthanolamine TEA de pH 8,9. Environ 300 μl de cellules ainsi reprises ont été lisées en présence de billes de verre (de 400 à 500 μm de diamètre) représentant environ la moitié du volume final. Ce mélange a été vortexé vigoureusement pendant 1 min, 4 fois, les échantillons étant placés pendant 30 s dans la glace entre chaque broyage. Le liquide a été retiré des tubes avec une pipette pasteur et transféré dans un microtube. Les billes de verre ont été lavées 1 fois avec environ 200 μl de tampon TEA de

pH 8,9. Les billes ont été vortexées pendant 1 min, 1 fois, et le liquide a été retiré à la pipette pasteur pour être ajouté au lysat précédent. Le lysat a été ensuite centrifugé dans un microtube pendant 5 min à 7 000 tr/min. Le surnageant a été précautionneusement retiré et conservé à -20°C pour le Western Blot, le dosage de l'activité urate oxydase et le dosage des protéines. Le culot des cellules lysées a été conservé séparément à -20°C pour le Western Blot (Cf. 3) ci-dessous).

D'autre part, des prélèvements des cultures réalisées en 1a) et 1b) ont été réalisés comme suit avant l'induction : 2 ml de culture ont été centrifugés pendant 10 min à 7 000 tr/min. Les culots ont été repris dans 500 µl d'eau distillée et de nouveau centrifugés pendant 5 min à 7 000 tr/min. Les culots ont été repris dans environ 200 µl de tampon TEA de pH 8,9 et lysés comme ci-dessus en présence de billes de verre. Les surnageants et les culots des cellules lysées ont été conservés à -20°C séparément.

3) Immunodétection de l'urate oxydase par Western Blot :

a) Mode opératoire

Les culots et les surnageants des différents échantillons 20 ont été soumis à un Western Blot, technique bien connue de l'homme de l'art, qui comprend les étapes suivantes :

- solubilisation du culot par ébullition pendant 10 min dans un tampon dénommé tampon de charge constitué de tris-HCl 0,125 M pH 6,8 SDS 4 %, bleu de bromophénol 0,002 %, glycérol 20 %, 25 β-mercaptopéthanol 10 % (selon le protocole décrit par LAEMMLI (U.K. LAEMMLI, *Nature*, 227 (1970), 680-685)), (étape mise en œuvre uniquement pour les culots),
- séparation électrophorétique des différentes protéines contenues dans le solubilisat selon le protocole décrit par LAEMMLI (U.K. LAEMMLI, *Nature*, 227 (1970), 680-685),
- transfert desdites protéines contenues dans le gel sur un filtre de nitrocellulose (selon la technique de H. TOWBIN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350-4354),

35 L'immunodétection, réalisée selon la technique de BURNETTE (W.W. BURNETTE *Anal. Biochem.* 112 (1981) 195-203), implique successivement :

- Le rinçage du filtre de nitrocellulose pendant 10 min avec un tampon A (tris-HCl 10 mM, NaCl 170 mM, KL 1 mM).
- La mise en contact du filtre de nitrocellulose pendant 30 min à 37°C avec un tampon B (tampon A additionné de sérum-albumine bovine à raison de 3 g pour 100 ml).
- La mise en contact du filtre de nitrocellulose pendant 1 h à 37°C avec un immunosérum (des anticorps polyclonaux reconnaissant l'urate oxydase d'*A. flavus*).
- Le rinçage du filtre de nitrocellulose avec le tampon B.
- La mise en contact du filtre de nitrocellulose pendant 1 h à 37°C avec une solution de protéine G marquée à l'iode 125 à 0,1 microcurie/ml.
- Le rinçage du filtre avec le tampon A.
- Le séchage du filtre entre deux feuilles absorbantes.
- La mise en contact d'un film radiographique.
- La révélation du film.

b) Résultats

On constate que les souches EMY761 pEMR469 (*ura*⁺), EMY761 pEMR473 (*ura*⁺), EMY761 pEMR469 (*leu*⁺) et EMY761 pEMR473 (*leu*⁺) produisent une protéine de poids moléculaire apparent d'environ 33 KDa qui est reconnue par les anticorps dirigés contre l'urate oxydase d'*A. flavus* et qui est absente de la souche témoin.

On constate également que les souches non induites ne produisent pas ou très peu de la protéine décrite ci-dessus.

La comparaison entre les quantités de cette protéine pour les culots et les surnageants permet de déduire qu'environ 80 % de celle-ci est sous forme soluble dans le lysat.

4) Dosage de l'activité urate oxydase :

L'activité urate oxydase a été mesurée sur les surnageants des cellules lysées selon le mode opératoire décrit à l'exemple 9 ci-dessus.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau (IV) ci-après. Celui-ci précise pour chaque souche induite au glycérol-éthanol, induite au glycérol-éthanol-galactose ou non induite, l'activité urate oxydase en U/ml.

TABLEAU IV

	Souche / Inducteur	Activité urate oxydase (U/ml)
05	EMY761/YP éthanol-glycérol-galactose	< 0,1
	EMY761/YP éthanol-glycérol	< 0,1
	EMY761 pEMR469 (ura ⁺)/(non induit)	0,4
	EMY761 pEMR469 (ura ⁺)/YP éthanol-glycérol	12
10	EMY761 pEMR469 (leu ⁺)/(non induit)	0,17
	EMY761 pEMR469 (leu ⁺)/YP éthanol-glycérol	36
	EMY761 pEMR473 (ura ⁺)/(non induit)	< 0,1
	EMY761 pEMR473 (ura ⁺)/YP éthanol-glycérol-galactose	12,5
15	EMY761 pEMR473 (leu ⁺)/(non induit)	< 0,1
	EMY761 pEMR473 (leu ⁺)/YP éthanol-glycérol-galactose	15,3

Il apparaît clairement sur le tableau ci-dessus que les cellules levure transformées par ces plasmides pEMR469 et pEMR473 sont capables après induction de produire une activité urate oxydase.

5) Dosage des protéines totales solubles dans les lysats :

Le kit protein assay de BIORAD a été utilisé pour doser les protéines totales présentes dans le surnageant des cellules lysées. Il est basé sur l'observation que l'absorbance maximum pour une solution acide de bleu brillant de Coomassie g-250 passe de 465 nm à 595 nm lorsque des protéines viennent s'y fixer (Cf. Reisner et al., Anal Biochem, 64, 509-(1975)).

30 a) Mode opératoire

On introduit dans la cuve d'un spectrophotomètre réglé à 595 nm les volumes suivants :

- 10 µl d'échantillon auxquels ont été rajoutés 790 µl d'eau distillée
- 200 µl de "Dye reagent" concentré (Biorad).

On mélange et on lit la densité optique à 595 nm. Une gamme étalon avec des concentrations croissantes de BSA (Bovine Serum Albumine) a été réalisée ainsi. On lit la concentration inconnue des protéines totales des lysats sur la courbe étalon obtenu.

05 b) Résultats

10 Les principaux résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau V ci-après. Celui-ci précise pour chaque souche induite au glycérol-éthanol, induite au glycérol-éthanol-galactose ou non induite, la quantité (en mg/ml) de protéines totales solubles ainsi que le pourcentage d'urate oxydase dans les protéines totales solubles (on admet ici que l'activité spécifique de la protéine recombinante est identique à celle de l'urate oxydase obtenue à partir d'*A. flavus* : 30 U/mg).

15

TABLEAU V

	20	Souche / Inducteur	Protéines totales solubles mg/ml	% d'urate oxydase dans les protéines totales solubles
		EMY761/glycérol-éthanol	5,3	< 0,05
		EMY761/glycérol-éthanol-galactose	5,8	< 0,05
25		EMY761 pEMR469 (ura ⁺)/non induit	8,5	0,25
		EMY761 pEMR469 (ura ⁺)/glycérol-éthanol	5,3	4,7
		EMY761 pEMR469 (leu ⁺)/non induit	1,7	0,3
		EMY761 pEMR469 (leu ⁺)/glycérol-éthanol	5,9	20
		EMY761 pEMR473 (ura ⁺)/non induit	10,3	< 0,05
30		EMY761 pEMR473 (ura ⁺)/glycérol-éthanol-galactose	6,5	6,4
		EMY761 pEMR473 (leu ⁺)/non induit	0,5	< 0,05
		EMY761 pEMR473 (leu ⁺)/glycérol-éthanol-galactose	3,9	13

35 On constate que le taux de production de l'urate oxydase varie de 5 à 20 % selon les transformants et le mode de sélection des transformés (leu⁺).

EXEMPLE 13 : Expression en fermenteur de 2,5 l de l'ADNc de L'urate oxydase pour la souche EMY761 pEMR473 (ura⁺)

1) Protocole de fermentation :

a) Milieux

05 Milieu inoculum

Une colonie de la souche EMY761 pEMR473 (ura⁺) a été mise en culture dans 200 ml de milieu liquide sans uracile (Cf. tableau III, exemple 11). La culture est poursuivie pendant une nuit sous agitation jusqu'à une DO d'environ 3.

10

Milieu de culture A

pour 1 l d'eau purifiée
sur un appareil de type Milli-q

15	glucose	30 g
	glycérol	30 g
	hydrolysat de caséine (Casamino-acids de DIFCO)	30 g
	base azotée de levure (Yeast Nitrogen Base de DIFCO)	15 g
20	extrait de levure (Yeast extract de DIFCO)	2,5 g
	K ₂ HPO ₄	3 g
	MgSO ₄ ,7H ₂ O	0,5 g

25 Milieu additionnel B

pour 100 ml d'eau purifiée
sur un appareil de type Milli-Q

30	glycérol	30 g
	hydrolysat de peptone (Le Primateone de G. Sheffield)	30 g
	base azotée de levure (Yeast Nitrogen Base de DIFCO)	15 g
	extrait de levure (Yeast extract de DIFCO)	5 g

K_2HPO_4	3 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g

b) Paramètres de fermentation

05 Bioréacteur de 2,5 l de volume total équipé de deux turbines
température = 30°C

pH = 5

pression partielle en oxygène = 30 mmHg

débit d'air = 1 l/min.

10 Le bioréacteur est rempli avec 1,5 l du milieu A et est
ensemencé avec 150 ml de l'inoculum.

Une fois que le glucose est épuisé à DO 2,5 vers DO 17,
l'induction a lieu par addition d'un volume de 150 ml de galactose
à 20 % poids/volume. La croissance est poursuivie, puis le milieu
15 additionnel B est ajouté aux environs de DO 30.

La croissance se prolonge une quinzaine d'heures et la
récolte a été effectuée à une DO 104.

2) Préparation et analyse des échantillons :

20 Les échantillons ont été préparés comme décrit dans
l'exemple 9 2) a) à partir de la culture en fermenteur. Deux prélè-
vements ont été réalisés : le premier après 7 h d'induction, le
second après 22 h d'induction.

Sur ces deux lysats obtenus après lyse des cellules, les
tests suivants décrits dans l'exemple 9 ont été réalisés :

25 - immunodétection par Western Blot
- dosage de l'activité biologique
- dosage des protéines totales.

Les résultats obtenus sont les suivants.

a) Immunodétection par Western Blot

30 On constate que la souche EMY761 pEMR473 (ura^+) cultivée
en fermenteur de 2 l produit une protéine de poids moléculaire
apparent de 33 KDa qui est reconnue par les anticorps dirigés
contre l'urate oxydase d'*A. flavus* : (préparés chez le lapin selon
des techniques bien connues de l'homme de l'art : Cf. VAITUKAITIS
35 et al. (1981) "Methods in Enzymology" Academic Press, New York,
vol. 73, p. 46) et qui est absente dans la souche témoin.

b) Dosage de l'activité biologique

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VI ci-après :

05

TABLEAU VI

10

Souche / Temps d'induction	U/ml
EMY761 pEMR473 (ura ⁺)/7 h	9
EMY761 pEMR473 (ura ⁺)/22 h	12,5

On constate que la souche EMY761 pEMR473 (ura⁺), cultivée en fermenteur, est capable, après induction, de produire une activité urate oxydase.

15

c) Dosage des protéines totales solubles

Les résultats sont rassemblés dans le tableau VII ci-après :

20

TABLEAU VII

25

Souche / Temps d'induction	Protéines totales solubles mg/ml	% d'urate oxydase dans les protéines totales solubles
EMY761 pEMR473 (ura ⁺)/7 h	5,2	5,7
EMY761 pEMR473 (ura ⁺)/21 h	6,2	6,6

30

Ces résultats indiquent que le taux de synthèse en urate oxydase de la souche EMY761 pEMR473 (ura⁺) cultivée en fermenteur est d'environ 5 % de protéines totales de la cellule après 7 h et 21 h d'induction.

EXEMPLE 14 : Expression en erlenmeyer de l'ADNc de l'urate oxydase par les souches EMY761 pEMR515 (leu⁺), EMY500 pEMR515 (leu⁺) et GRF18 pEMR515 (leu⁺)

05 Une colonie de chacune des trois souches ci-dessus a été mise en culture dans 20 ml de milieu liquide sans leucine.

Après une nuit à 30°C sous agitation, les trois cultures ont été centrifugées pendant 10 min à 7 000 tr/min. Les culots cellulaires ont été repris dans 10 ml d'eau distillée stérile et de 10 nouveau centrifugés pendant 10 min. L'expression de l'urate oxydase a été induite en reprenant les cellules dans 20 ml de milieu YP éthanol-glycérol-galactose (Cf. tableau I, exemple 8). Les cultures ont été replacées à 30°C sous agitation pendant environ 20 h. En témoin, une culture de chaque souche hôte, non transformée, a été 15 effectuée.

Les cellules de chacune des six cultures sont reculotées par centrifugation et le surnageant est éliminé. Les culots ont été repris dans 10 ml d'eau distillée et centrifugés pendant 10 min à 20 7 000 tr/min. Les culots ainsi lavés ont été repris dans environ 1 ml de tampon TEA de pH 8,9 et le broyage ainsi que l'élimination des particules par centrifugation ont été réalisés comme décrit dans l'exemple 9, 2). Le surnageant de chaque culture sert comme précédemment à un dosage de l'urate oxydase et des protéines totales. Les principaux résultats obtenus sont rassemblés dans le 25 tableau VIII ci-après :

TABLEAU VIII

	Souche/Conditions de culture	Activité urate oxydase (U/ml)	Protéines totales solubles (mg/ml)	% d'urate oxydase dans les protéines solubles
05	GRF18 pEMR515 (leu ⁺)/a)	< 0,1	2,2	< 0,05
	EMY500 pEMR515 (leu ⁺)/a)	< 0,1	0,9	< 0,05
	EMY761 pEMR515 (leu ⁺)/a)	< 0,1	1,8	< 0,05
	GRF18 pEMR515 (leu ⁺)/b)	38	5,4	23 %
	EMY500 pEMR515 (leu ⁺)/b)	20	2,5	26 %
	EMY761 pEMR515 (leu ⁺)/b)	33	4,2	26 %

a) : les souches sont cultivées en présence de glucose (conditions de non-induction)

b) : les souches sont cultivées en absence de glucose et en présence de galactose (induction).

Ces résultats montrent que l'on peut obtenir un haut niveau d'expression d'urate oxydase avec trois souches réceptrices non isogéniques transformées par le vecteur d'expression selon l'invention.

EXEMPLE 15 : Expression en fermenteur de 2,5 l de l'ADNc de l'urate oxydase pour la souche EMY500 pEMR515. Purification et caractérisation partielle de l'urate oxydase recombinante

1) Culture en fermenteur de 2,5 l de la souche EMY500 pEMR515 :

La culture de la souche EMY500 pEMR515 se fait en fermenteur et se déroule de la manière suivante :

a) Phase de préculture en erlenmeyer

A partir de 1 ml de solution dans un milieu contenant 20 % de glycérol de la souche EMY500 pEMR515 avec un nombre de cellules correspondant à une DO de 2,35, on ensemence un erlenmeyer de 500 ml contenant 90 ml de milieu de croissance phase autoclave MCPA complémenté par 1,28 g de MES (2/N-morpholino/-ethanesulfonic

acid : Sigma n° M 8250) et 10 ml de milieu de croissance phase filtrée MCPF. Les compositions des milieux MCPA et MCPF sont précisées ci-après. Après 24 heures d'incubation, sous agitation à 30°C, la densité optique de la culture est d'environ 7.

05

b) Phases de culture en fermenteur

La culture ci-dessus est utilisée pour ensemencer un fermenteur 2,5 l, contenant le milieu de culture de composition suivante :

10

900 ml de MCPA

+ 200 ml de MCPF

Le pH de la culture est régulé par le fermenteur à la valeur de consigne qui est 5,5. Après 6 à 7 h de culture à 30°C, on ajoute de manière linéaire et pendant 9 h, 72 ml d'une solution de glucose à 500 g/l soit en tout 36 g de glucose.

15

c) Phase d'expression

Au mélange précédemment décrit, on ajoute 100 ml de milieu d'expression phase autoclavable MEPA et 150 ml de milieu d'expression phase filtrée MEPF (dont les compositions sont précisées ci-après). La culture est alors continuée pendant 5 h. Puis, on ajoute de façon linéaire, pendant 20 h, 150 ml d'une solution contenant 30 g de galactose, 15 g de glycérol et 36 g d'éthanol. On obtient alors une D.O. voisine de 160.

COMPOSITION CHIMIQUE DES MILIEUX DE CROISSANCE ET D'EXPRESSION

- Milieu de croissance phase autoclavable MCPA

pour 900 ml final

30

NTA (acide nitritotriacétique)	1,2 g
extrait de levure (DIFCO)	6 g
K ₂ SO ₄	1,2 g
NaCl	0,6 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,2 g

	<chem>CaCl2</chem> , 2H ₂ O	840 mg
	<chem>FeCl3</chem>	108 mg
	acide glutamique	4,44 g
	HYCASE SF (Sheffield Products)	30 g
05	leucine	2,16 g
	histidine	600 mg
	méthionine	1,2 g
	oligoéléments I (Cf. ci-après)	5 mL
	<u>uracile</u>	<u>1,2 g</u>

10

Liste des oligoéléments I

pour 1 l d'eau ultrapurifiée

	<chem>CuSO4</chem> , 5H ₂ O	780 mg
15	<chem>H3BO3</chem>	5 g
	<chem>ZnSO4</chem> , 7H ₂ O	3 g
	KI	1 g
	<chem>MnSO4</chem> , 2H ₂ O	3,5 g
	<chem>Na2MoO4</chem> , 2H ₂ O	2 g
20	<u><chem>FeCl3</chem>, 6H₂O</u>	<u>4,8 g</u>

Ajouter à la solution 100 mL d'acide chlorhydrique concentré.
 Compléter à 1 000 mL.

25 - Milieu de croissance phase filtrée MCPF

pour 200 mL final d'eau ultrapurifiée

	<chem>KH2PO4</chem>	4,8 g
30	tryptophane	420 mg
	vitamine I (Cf. ci-après)	5 mL
	glucose	36 g

35 Chauffer pour dissoudre, tempérer, ajouter les vitamines I et filtrer à 0,2 μ .

Liste des vitamines I

pour 100 ml final d'eau ultrapurifiée

	biotine	1,2 mg
05	acide folique	1 mg
	niacine	144 mg
	(acide nicotinique)	
	pyridoxine. HCl	60 mg
	thiamine. HCl	240 mg
10	pantothéate de calcium	1,2 g
	mésoinositol	2,4 g

Compléter à 100 ml après dissolution.

Filtrer à froid stérilement à 0,2 μ .

15

- Milieu d'expression phase autoclavable MEPA

pour 100 ml d'eau ultrapurifiée

20	NTA	1,2 g
	K_2SO_4	2,08 g
	acide glutamique	6 g
	HYCASE SF (Sheffield Products)	24 g
	leucine	2,16 g
25	histidine	600 mg
	méthionine	1,2 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	720 g
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	840 mg
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	108 mg
30	oligoéléments liste 1	5 mL
	uracile	1,2 g

Ajuster le pH à 5,5 avec H_2SO_4 concentré ou KOH concentré.
Autoclaver 20 min à 120°C.

35

- Milieu d'expression phase filtrée MEPF

pour 150 ml final d'eau ultrapurifiée

05	KH_2PO_4	2,4 g
	tryptophane	420 mg
	vitamines I	5 ml
	glycérol	36 g
	galactose	45 g

10

Chauffer pour dissoudre, tempérer, ajouter les vitamines et filtrer.

2) Broyage des cellules

15 Après 20 heures d'induction, la densité optique, mesurée à 600 nm, de la culture est de 98. 800 g de mout fermentation sont centrifugés 5 min à 10 000 g et le culot cellulaire est repris dans 80 ml de tampon de lyse (glycine 20 mM pH 8,5). Les cellules sont alors broyées à 4°C, 2 fois pendant 2,5 min dans un broyeur
 20 (Vibrogen Zellmühle V14) en présence d'un volume de billes de 0,5 mm de diamètre, égal au volume de la solution de cellules à lyser. Après broyage, le surnageant est repris et les billes sont lavées deux fois par 80 ml de tampon de lyse. On récupère 210 ml de lysat possédant un taux de protéines totales d'environ 3 mg/ml et
 25 une activité urate oxydase d'environ 7,7 U/ml (soit un pourcentage d'urate oxydase par rapport aux protéines totales d'environ 8,5 % en supposant une activité spécifique de cette dernière de 30 U/mg).

3) Purification de l'urate oxydase recombinante

30

a) Protocole de purification

On soumet le lysat précédent au protocole de purification à deux étapes décrit ci-après.

ETAPE 1 :

Chromatographie anionique :

05 Support :

DEAE (diéthylaminosulfate) sépharose fast flow (Pharmacia réf. 17.07.09.91).

Le gel une fois tassé occupe un volume de 70 ml.

10 La séparation est effectuée à température ambiante, les fractions récoltées, conservées à 0°C.

Conditions de séparation :

15 On utilise un gradient de force ionique de chlorure entre un tampon 1 (borate de sodium 10 mM, pH 9,2) et un tampon 2 (borate de sodium 10 mM, chlorure de sodium 1 M). Les tampons sont préalablement dégazés et lors de l'élution sont conservés à 0°C. Dans chaque tampon il a été ajouté l'équivalent de 0,02 % d'azide.

20

L'extrait brut est déposé (10 ml) et élué avec le tampon 1 jusqu'à la collecte complète de l'urate oxydase (par fractions de 10 ml), qui n'est pas retenue sur la colonne.

25 Les pigments et les protéines contaminantes sont ensuite éliminés en éluant avec le tampon 2.

La purification est suivie par mesure de la densité optique de l'éluat à 214 nm.

ETAPE 2 :

30

Chromatographie liquide haute pression sur phase inverse :

Support :

35 Colonne à base de silice greffée C8, l'Aquapore OD-300 (100 x 2,1 mm) (Brownlee-Applied Biosystems)

Conditions opératoires :

Eluant 1 : Eau ultrapurifiée (passée à travers un système Millipore) avec 0,1 % d'acide trifluoroacétique.

05 Eluant 2 : Acétonitrile (de qualité spectrophotométrique ou équivalent) avec 0,08 % d'acide trifluoroacétique.

Débit : 0,3 ml/min.

Le gradient est de 35 % acétonitrile/TFA à 70 % acétonitrile/TFA en 20 min, on maintient à 70 % pendant 5 min. La quantité injectée est 10 de 1 ml par run.

Collecte des fractions :

Le déroulement de la séparation est suivi par mesure de la densité optique à 218 nm. L'acétonitrile est évaporé lors de la centrifugation sous vide.

b) Résultats :

20 L'échantillon avant et après la première étape de purification a été analysé par chromatographie liquide sur une colonne de silice greffée C8, l'Aquapore OD-300 décrite précédemment avec le même gradient, avec une quantité injectée de 50 µl. On utilise comme témoin externe l'urate oxydase d'*A. flavus* purifiée.

25 Dans le lysat de départ, l'urate oxydase représente 63 % des protéines totales. Après la première étape de purification l'urate oxydase représente 84 % des protéines totales.

30 La totalité de l'échantillon obtenu à l'issue de la seconde étape, lequel contient certainement plus de 84 % d'urate oxydase, a été utilisée pour la caractérisation partielle décrite ci-après.

4) Caractérisation partielle de l'urate oxydase recombinante.

a) Analyse d'acides aminés

05 L'analyse des acides aminés de l'hydrolysat acide de l'urate oxydase recombinante purifiée a été effectuée sur un analyseur d'Applied Biosystems modèle 420-130A. La répartition des acides aminés quantifiés est compatible (pas de différence significative) avec la séquence supposée. Le même résultat a été observé pour l'urate oxydase d'*A. flavus* extractive purifiée (obtenue à l'exemple 4).

10 b) Carte peptidique tryptique

15 Une carte peptidique tryptique a été établie pour l'urate oxydase recombinante purifiée et pour l'urate oxydase extractive purifiée (obtenue à l'exemple 4) dans les conditions suivantes :

20 On prépare une solution d'usage oxydase à une concentration d'environ 1 mg/ml et extemporanément une solution de trypsine à une concentration de 1 mg/ml.

25 Les deux solutions sont mises en présence dans une proportion enzyme/substrat de 1/30 pendant 8 heures à température ambiante. L'hydrolysat tryptique est ensuite soumis à une chromatographie en phase liquide sur une colonne à base de silice greffée C18,5 µm, Lichrosorb (250 x 4,6 mm) (Hichrom-réf.RP 18-5-250A), équipé d'un détecteur UV à 218 couplé à un enregistreur. Le gradient appliqué est de 1 % acétonitrile/TFA à 60 % acétonitrile/TFA en 120 min, puis on maintient à 60 % pendant 5 min.

30 Les cartes peptidiques obtenues ont un profil très proche.

3) Mise en évidence du caractère bloqué de la séquence aminoterminale :

30 La séquence amino-terminale a été analysée à l'aide d'un séquenceur Applied Biosystem modèle 470A, couplé à un analyseur de dérivés phénylthioïdantoïques Applied Biosystem modèle 120A. L'urate oxydase recombinante purifiée (200 pmoles contrôlées par

analyse d'acides aminés) a été déposée sur le séquenceur en présence de 20 pmoles de β -lactoglobuline, protéine témoin.

05 Aucune séquence amino-terminale correspondant à une séquence de l'urate oxydase n'a été détectée (par contre la séquence amino-terminale de la protéine témoin a été détectée).

L'urate oxydase recombinante a donc, comme l'urate oxydase extractive, l'extrémité amino-terminale bloquée.

10 Exemple 16 : Construction d'un vecteur d'expression de l'ADNc de l'urate oxydase dans les cellules animales, le plasmide PSV860.

15 Ce vecteur a été obtenu par :

20 - ligation du petit fragment AccI-SnaBI contenant une séquence codant pour l'urate oxydase à l'exception des 16 premiers acides aminés, issu du plasmide p466 : vecteur d'expression de l'urate oxydase d'A. flavus dans E. coli disponible au laboratoire et décrit ci-après, à un fragment synthétique HindIII-AccI, ce qui a permis d'obtenir un fragment HindIII-SnaBI contenant une séquence complète codant pour l'urate oxydase d'A. flavus et une séquence 5' non traduite favorable à l'expression dans les cellules animales.

25 - Insertion du fragment HindIII-SnaBI entre les sites HindIII et SnaBI du polysite de clonage (également appelé polylinker) du vecteur d'expression pour les cellules animales, le plasmide pSE₁.

30 L'exposé ci-après présentera successivement la construction du plasmide p466, celle du plasmide pSE₁ et l'assemblage du plasmide PSV860.

1) Construction du plasmide p466

35 On a préparé le plasmide p466, vecteur d'expression de l'ADNc de l'urate oxydase dans E. coli. Ce dernier comprend un fragment de pBR327 incluant l'origine de réplication et le gène de

réistance à l'ampicilline, il comprend également un promoteur synthétique d'*E. coli* (R. RODRIGUEZ et M. CHAMBERLIN "Promoters-Structure and function (1982) Preager), une séquence de Shine-Dalgarno, suivie d'un polylinker présentant les sites uniques NdeI 05 et KpnI, un terminateur de transcription (dérivé du phage fd) et le gène lac i.

Ce plasmide a été construit à partir d'un plasmide d'expression de l'hGH dans *E. coli* (p462) par substitution d'un fragment portant le gène de l'hGH par l'ADNc de l'urate oxydase. 10

La construction du plasmide p466 a été décrite en détail dans l'exemple 7 ci-dessus.

2) Construction d'un vecteur d'expression pour les cellules animales, le plasmide pSE₁ 15

La stratégie mise en oeuvre fait appel à des fragments obtenus à partir de plasmides préexistants accessibles au public et à des fragments préparés par voie de synthèse selon les techniques maintenant couramment utilisées. Les techniques de 20 clonage employées sont celles décrites par T. MANIATIS, EF. FRITSCH et J. SAMBROOK dans "Molecular Cloning, a laboratory manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, 1984). La synthèse des oligonucléotides est réalisée à l'aide d'un synthétiseur d'ADN Biosearch 4 600.

La description ci-après sera mieux comprise en référence 25 à la figure 13, qui représente une carte d'assemblage du plasmide pSE₁, les sites ayant disparu par ligation étant notés entre parenthèses. Les symboles utilisés dans cette figure seront précisés dans l'exposé ci-après.

Ce plasmide a été construit par ligations successives des éléments ci-après :

- 1) - un fragment PvuII-PvuII - symbolisé par +++++ sur la figure 13 - de 2525 pb, obtenu par digestion complète du plasmide pTZ18R (Pharmacia) à l'aide de l'enzyme de restriction PvuII. Ce fragment contient l'origine de réPLICATION du phage F1 (notée ORI F1 sur la figure 13), un gène (noté Amp^R sur la figure 13) portant la résistance à l'ampicilline et l'origine de réPLICATION (notée ORI pBR322 sur la figure 13) permettant la réPLICATION de ce plasmide dans *E. coli*. Le premier site franc PvuII disparaît par lIGATION avec le site franc EcoRV (qui disparaît également) du fragment décrit en 7).
- 2) - Un fragment PvuII-HpaI - symbolisé par sur la figure 13 - de 1060 pb de l'ADN d'adénovirus type 5 entre les positions 11299 (site de restriction PvuII) et 10239 (site de restriction HpaI) (DEKKER * VAN ORMONDT, Gene 27, 1984, 115-120) contenant l'information pour les ARN VA-I et VA-II. Le site franc HpaI disparaît par lIGATION avec le site franc PvuII (qui disparaît également) du fragment décrit en 3).
- 3) - Un fragment PvuII-HindIII - symbolisé par |||| sur la figure 13 - de 344 pb, issu de l'ADN du virus SV40 obtenu par digestion complète à l'aide des enzymes de restriction PvuII et HindIII. Ce fragment comporte l'origine de réPLICATION et le promoteur précoce de l'ADN du virus SV40 (réf. B.J. BYRNE et al. PNAS-USA (1983), 80, 721-725).
Le site HindIII disparaît par lIGATION avec le site Liant à HindIII du fragment décrit en 4).
- 4) - Un fragment synthétique "site Liant à HindIII"-HindIII - symbolisé par sur la figure 13 - de 419 pb dont la séquence donnée ci-après est proche de la séquence 5' non traduite du virus HTLV1 (réf. WEISS et al, "Molecular Biology of Tumor Viruses - part 2-2^e ed - 1985 - Cold Spring Harbor Laboratory - p. 1057).

site liant à HindIII

AGCTGGCTCGCATCTCTCCTCACGCGCCGCCCTACCTGAGGCCATCCACGCC
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 CCGAGCGTAGAGAGGAAGTGCAGGGCGGGATGGACTCCGGCGGTAGGTGCGG
 05
 GGTGAGTCGCAGTTCTGCCGCCTCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACCTGCCTCGCCGTCTA
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 CCACTCAGCGCAAGACGGCGGAGGGCGGACACCACGGAGGACTTGACGCAGGCGGCAGAT
 10
 GGTAGGCTCCAAGGGAGCCGGACAAAGGCCCGGTCTGACCTGAGCTCTAAACTTACCTA
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 CCATCCGAGGTTCCCTCGGCCTGTTCCGGGCCAGAGCTGGACTCGAGATTGAAATGGAT
 15
 GACTCAGCCGGCTCTCACGCTTGCCCTGACCTGCTCAACTCTACGTCTTGT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 CTGAGTCGGCCGAGAGGTGCGAAACGGACTGGGACGAACGAGTTGAGATGCAGAAACAAA
 20
 CGTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAACCTCAAGGTATGCGCTGGGACCTGGCAGGCAGGCT
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 GCAAAAGACAAGACGCGGCAATGTTGAAGTTCCATACGCGACCTGGACCGTCCGCCGTA
 25
 CTGGGACCCCTAGGAAGGGCTTGGGGTCTCGTGCCAAGGCAGGGAACATAGTGGTCC
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 GACCCCTGGGGATCCTTCCCGAACCCCCAGGAGCACGGGTTCCGTCCCTGTATCACCAAGG
 30
 CAGGAAGGGGAGCAGAGGCATCAGGGTGTCCACTTGTCTCCGCAGCTCTGAGCCTGCA
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 GTCCTTCCCGTCTCCGTAGTCCCACAGGTGAAACAGAGGCGTCGAGGACTCGGACGT
 GA

 CTTCGA 
 HindIII

5) - Un fragment synthétique HindIII "site liant à BamHI" - symbolisé par ~~XXXX~~ sur la figure 13 - contenant le promoteur de l'ARN-polymérase du phage T7 ainsi qu'un polylinker contenant le site de clonage SmaI.

05

AGCTTGTGACTAATACGACTCACTATAGGGCGGCCGC[▲]GGGCCCCCTGCAGGAATTC
 ACAGCTGATTATGCTGAGTGATATCCC[▲]GCCCCGGCGCCCCGGGGACGT[▲]TCCTTAAG
 HindIII
 SmaI site liant à BamHI
 10 GGATCCCCGGGTGACTGACT[▼]
 CCTAGGGGGCCC[▼]ACTGACTGACTAG

15 6) - Un fragment BamHI-BcII de 240 pb - représenté par ~~VV~~ sur la figure 13 -, petit fragment obtenu par digestion complète à l'aide des enzymes BcII et BamHI du virus SV40 qui contient le site de polyadénylation tardif de ce dernier. (M. FITZGERALD et al. Cell, 24, 1981, 251-260). Les sites BamHI et BcII disparaissent par ligations avec respectivement le site liant à BamHI du fragment décrit en 5) et le site BamHI (qui disparaît également du fragment décrit en 7).

25 7) - Un fragment BamHI-EcoRV - symbolisé par ~~OOOO~~ sur la figure 13 - de 190 pb, petit fragment issu du plasmide pBR322 après digestion complète à l'aide des enzymes EcoRV et BamHI.

3) Construction du plasmide pSV860

Le plasmide p466 (cf. figure 9) a été soumis à une digestion complète à l'aide des enzymes AccI et SnaBI. Le petit fragment AccI-SnaBI, qui contient une séquence d'ADN codant pour l'urate oxydase à l'exception des 16 premiers acides aminoterminal, a été purifié et ligué au fragment synthétique HindIII-AccI de séquence suivante :

HindIII

AccI

AGCTTGGCGCCACTATGTCCGCAGTAAAGCAGCCCGCTACGGCAAGGACAATGTCCCGCT

ACGGCGGTGATACAGGCGTCATTTCTGTCTGGGGATGCCGTTCCTGTTACACGGGGACA

05

Cette ligation permet d'obtenir le fragment HindIII-SnaBI, qui contient une séquence codant pour l'urate oxydase identique à celle du clone 9C et une séquence 5' non traduite favorable à l'expression dans les cellules animales (KOZAK, M., Nucl. Acids Res., 12, 2, 1984, 857-872).

Le fragment HindIII-SnaBI contient la séquence :

15	5'	-AGCTTGCCG CAATGTCCGC CGGTGTACGA TCTTACACCA GAACACCATT TGTTCGGCTC CATGCCGCTC TGACGGCAAG GGAATGTGCA TCTCTGTCCG CTTCCTGCGT TGAGCACCGA CAGGAGGTCC TCGCGAGGTC AGGCCACTAT ATCGAGACTG CCTGAGCTGG TCGCTCCTCA TCCTCTCTGA	CCACTATGTC GTCTACAAGG GATGACCGTC AGGCCGACAA TACATCACCG CATCCTGGC ACGTCAACAT CCACACCCCTC GGTGGACGTG GCCTGACCGT GACGAGTACA CGTCGATGCC GCTCGCACGT ACTCTGAAGA GTACAAGATG TCGAGTACTC CACAAGGGCC GTCGGACCCC AGTCTAAATT	CGCAGTAAAA TTCACAAGGA TGTGTGCTTC CAGCGTCATT CCAAGCAGAA ACACACTTCA TGTCTGCCAC ACTCCTTCAT GTCGAGGGCA GCTGAAGAGC CCACACTTAA ACTTGGCAGT GCCTAAGTT CTTTTGCTGA GCAGAGCAA GTTGCCTAAC TCCAAAACAC AACGGTCTGA G	GCAGCCCCGCT CGAGAAGACC TGGAGGGTGA GTCGCAACCG CCCCGTTACT TTGAGAAGTA CGCTGGACCC CCGCGACAGC AGGGCATCGA ACCAACTCGC GGAGACCTGG GGAAGAATT GATGCTACCT AGATAAACAGT TCCTGGCGCG AAGCACTATT CGGCAAGAAC TCAAGTGTAC	ACGGCAAGGA GGTGTCCAGA GATTGAGACC ACTCCATTAA CCTCCCGAGC CAACCACATC GGATGGACAT GAGGAGAAGC TATCAAGTCG AGTTCTGGGG GACCGTATCC CAGTGGACTC GGGCCACTGC GCCAGCGTGC CCAGCAGCTG TCGAAATCGA GCCGAGGTCT CGTCGGCCGG
20						
25						
30						

35 Le fragment HindIII-SnaBI a ensuite été inséré dans le vecteur pSE₁, préalablement incubé avec les enzymes HindIII et SmaI. On a ainsi obtenu le plasmide pSV860, représenté sur la figure 14.

dans laquelle les symboles ont la même signification que dans la figure 13, le nouveau fragment HindIII-SnaBI étant symbolisé par ~~---~~ (Les sites SnaBI et SmaI ont disparu par ligation).

05 Exemple 17 : Expression transitoire de l'ADNc de l'urate oxydase dans les cellules COS. Dosage de l'activité urate oxydase dans le lysat cellulaire.

Les cellules COS sont des cellules de reins de singe exprimant l'antigène T du virus SV40 (Gluzman, Y. Cell 23, 1981, 10 175-182). Ces cellules, qui permettent la réplication des vecteurs contenant l'origine de réplication de l'ADN du virus SV40, constituent des hôtes de choix pour l'étude de l'expression de gènes dans les cellules animales.

15 1) Transfection des cellules COS et expression transitoire de l'ADNc de l'urate oxydase.

4.10⁵ cellules COS sont étalées dans une boîte de Pétri de 6 cm de diamètre (Corning) dans 5 ml de milieu modifié d'Eagle selon Dulbecco ci-après appelé DMEM (le Dulbecco's modified Eagles medium de Gibco), lequel contient 0,6 g/l glutamine, 3,7 g/l NaHCO₃ et est complémenté avec du sérum de veau foetal (GIBCO) à raison de 5%. Après environ 16 h de culture à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de dioxyde de carbone, le milieu de culture est enlevé par aspiration et les cellules sont lavées avec 3 ml de tampon PBS (le Phosphate Buffer Saline de GIBCO). On y ajoute alors le mélange suivant : 1 000 µl de (DMEM + 10% sérum de veau foetal (GIBCO)), 20 110 µl de diéthylaminoéthyl-dextrane de poids moléculaire moyen 500 000, à une concentration de 2 mg/ml (Pharmacia), 1,1 µl de chloroquine 100mM (Sigma) et 3 µg d'ADN soit du plasmide pSV860, 25 soit du plasmide pSE₁ (pour le témoin). Après 5 h d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de dioxyde de carbone, le mélange est retiré des cellules. On y ajoute alors 2 ml de tampon PBS contenant 10% de diméthyl sulfoxyde (qualité Spectroscopie, 30 Merck). Après 1 min d'incubation à la température ambiante, le mélange est retiré et les cellules sont lavées deux fois avec du tampon PBS. On y ajoute 5 ml de DMEM complémenté avec du sérum de 35

veau foetal à raison de 2%. L'incubation est poursuivie pendant 4 jours à 37°C sous atmosphère contenant 5% de dioxyde de carbone.

2) Préparation des échantillons.

05 Le milieu de culture est aspiré et les cellules COS sont rincées deux fois avec 3 ml de tampon PBS. Les cellules sont alors recueillies par grattage avec une spatule en caoutchouc (un "Policeman") dans 1 ml de tampon PBS. Après grattage, la boîte est rincée avec 1 ml de tampon PBS. Les deux suspensions cellulaires 10 sont combinées et centrifugées pendant 10 min à 1 000 tr/min. Le surnageant est enlevé et le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 ml de tampon de triéthanolamine (TEA) 0,05 M de pH 8,9/EDTA.

15 Les cellules sont lysées par sonication (sur de la glace) par des pulsations de 10 s avec un sonicateur (le Vibra Cell de Sonics and Materials Inc. USA) réglé à une puissance de 12 W. Le lysat cellulaire est centrifugé pendant 10 min à 10 000 tr/min et le surnageant est récupéré pour le dosage de l'urate oxydase.

20 3) Dosage de l'activité urate oxydase.

Le dosage de l'activité urate oxydase a été effectué comme décrit à l'exemple 9.

25 Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-après :

30	Cellules COS transfектées par	Activité urate oxydase U/ml
	pSV860	0,105
	pSE ₁	<0,01

On constate que les cellules COS transfectées par le plasmide pSV860, porteur de l'ADNc de l'urate oxydase, expriment un niveau appréciable d'activité urate oxydase, alors qu'aucune activité urate oxydase n'est détectable sur le témoin. Il y a donc expression de l'ADNc de l'urate oxydase.
05

REVENDICATIONS

05 1. Protéine, caractérisée en ce qu'elle présente une activité urate oxydase spécifique d'au moins 16 U/mg et en ce qu'elle a la séquence ci-après :

Ser Ala Val Lys Ala Ala Arg Tyr Gly Lys Asp Asn Val Arg Val Tyr Lys Val His Lys Asp Glu Lys Thr Gly Val Gln Thr Val Tyr Glu Met Thr Val Cys Val Leu Leu Glu Gly Glu Ile Glu Thr Ser Tyr Thr Lys Ala Asp Asn 10 Ser Val Ile Val Ala Thr Asp Ser Ile Lys Asn Thr Ile Tyr Ile Thr Ala Lys Gln Asn Pro Val Thr Pro Pro Glu Leu Phe Gly Ser Ile Leu Gly Thr His Phe Ile Glu Lys Tyr Asn His Ile His Ala Ala His Val Asn Ile Val Cys His Arg Trp Thr Arg Met Asp Ile Asp Gly Lys Pro His Pro His Ser Phe Ile Arg Asp Ser Glu Glu Lys Arg Asn Val Gln Val Asp Val Val Glu 15 Gly Lys Gly Ile Asp Ile Lys Ser Ser Leu Ser Gly Leu Thr Val Leu Lys Ser Thr Asn Ser Gln Phe Trp Gly Phe Leu Arg Asp Glu Tyr Thr Thr Leu Lys Glu Thr Trp Asp Arg Ile Leu Ser Thr Asp Val Asp Ala Thr Trp Gln Trp Lys Asn Phe Ser Gly Leu Gln Glu Val Arg Ser His Val Pro Lys Phe Asp Ala Thr Trp Ala Thr Ala Arg Glu Val Thr Leu Lys Thr Phe Ala Glu 20 Asp Asn Ser Ala Ser Val Gln Ala Thr Met Tyr Lys Met Ala Glu Gln Ile Leu Ala Arg Gln Gln Leu Ile Glu Thr Val Glu Tyr Ser Leu Pro Asn Lys His Tyr Phe Glu Ile Asp Leu Ser Trp His Lys Gly Leu Gln Asn Thr Gly Lys Asn Ala Glu Val Phe Ala Pro Gln Ser Asp Pro Asn Gly Leu Ile Lys Cys Thr Val Gly Arg Ser Ser Leu Lys Ser Lys Leu 25 précédée éventuellement d'une méthionine, ou en ce qu'elle présente un degré d'homologie substantiel avec séquence.

2. Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente une activité urate oxydase spécifique d'environ 30 U/mg.

30 3. Protéine selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que, par analyse sur gel bidimensionnel, elle présente un spot de masse moléculaire d'environ 33,5 kDa et de point isoelectrique voisin de 8,0, représentant au moins 90 % de la masse protéique.

35 4. Protéine selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle a un taux de pureté, déterminé par chromato-

graphie liquide sur une colonne de silice greffée C8, supérieur à 80 %.

5. Protéine selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle a un point isoélectrique voisin de 8,0.

05 6. Protéine selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle porte un groupement bloquant, de préférence de masse moléculaire voisine de 43 unités de masse atomique, sur la sérine amino-terminale.

10 7. Médicament, caractérisé en ce qu'il contient la protéine selon l'une des revendications 1 à 6.

8. Gène recombinant, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'ADN codant pour la protéine de séquence ci-après :

Met Ser Ala Val Lys Ala Ala Arg Tyr Gly Lys Asp Asn Val Arg Val
15 Tyr Lys Val His Lys Asp Glu Lys Thr Gly Val Gln Thr Val Tyr Glu
Met Thr Val Cys Val Leu Leu Glu Gly Glu Ile Glu Thr Ser Tyr Thr Lys
Ala Asp Asn Ser Val Ile Val Ala Thr Asp Ser Ile Lys Asn Thr Ile Tyr
Ile Thr Ala Lys Gln Asn Pro Val Thr Pro Pro Glu Leu Phe Gly Ser Ile
Leu Gly Thr His Phe Ile Glu Lys Tyr Asn His Ile His Ala Ala His Val
20 Asn Ile Val Cys His Arg Trp Thr Arg Met Asp Ile Asp Gly Lys Pro
His Pro His Ser Phe Ile Arg Asp Ser Glu Glu Lys Arg Asn Val Gln
Val Asp Val Va Glu Gly Lys Gly Ile Asp Ile Lys Ser Ser Leu Ser Gly
Leu Thr Val Leu Lys Ser Thr Asn Ser Gln Phe Trp Gly Phe Leu Arg Asp
Glu Tyr Thr Thr Leu Lys Glu Thr Trp Asp Arg Ile Leu Ser Thr Asp Val
25 Asp Ala Thr Trp Gln Trp Lys Asn Phe Ser Gly Leu Gln Glu Val Arg Ser
His Val Pro Lys Phe Asp Ala Thr Trp Ala Thr Ala Arg Glu Val Thr Leu
Lys Thr Phe Ala Glu Asp Asn Ser Ala Ser Val Gln Ala Thr Met Tyr Lys
Met Ala Glu Gln Ile Leu Ala Arg Gln Gln Leu Ile Glu Thr Val Glu Tyr
Ser Leu Pro Asn Lys His Tyr Phe Glu Ile Asp Leu Ser Trp His Lys Gly
30 Leu Gln Asn Thr Gly Lys Asn Ala Glu Val Phe Ala Pro Gln Ser Asp Pro
Asn Gly Leu Ile Lys Cys Thr Val Gly Arg Ser Ser Leu Lys Ser Lys Leu

9. Gène recombinant selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il permet une expression dans les micro-organismes procaryotes.

10. Gène recombinant selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite séquence d'ADN contient la séquence ci-après :

05 ATGTCTGCGG TAAAAGCAGC GCGCTACGGC AAGGACAATG TTGCGGTCTA
CAAGGTTCAC AAGGACGAGA AGACCGGTGT CCAGACGGTG TACGAGATGA
CCGTCTGTGT GCTTCTGGAG GGTGAGATTG AGACCTCTTA CACCAAGGCC
GACAACAGCG TCATTGTCGC AACCGACTCC ATTAAGAACCA CCATTTACAT
CACCGCCAAG CAGAACCCCCG TTACTCCTCC CGAGCTGTTG GGCTCCATCC
10 TGGGCACACA CTTCATTGAG AAGTACAACC ACATCCATGC CGCTCACGTC
AACATTGTCT GCCACCGCTG GACCCGGATG GACATTGACG GCAAGCCACA
CCCTCACTCC TTCATCCGCG ACAGCGAGGA GAAGCGGAAT GTGCAGGTGG
ACGTGGTCGA GGGCAAGGGC ATCGATATCA AGTCGTCTCT GTCCGGCCTG
ACCGTGCTGA AGAGCACCAA CTCGCAGTTG TGGGGCTTCC TGCACGAGA
15 GTACACCACA CTTAAGGAGA CCTGGGACCG TATCCTGAGC ACCGACGTCG
ATGCCACTTG GCAGTGGAAAG AATTCAGTG GACTCCAGGA GGTCCGCTCG
CACGTGCCATA AGTCGATGC TACCTGGGCC ACTGCTCGCG AGGTCACTCT
GAAGACTTTT GCTGAAGATA ACAGTGCCAG CGTGCAGGCC ACTATGTACA
AGATGGCAGA GCAAATCCTG GCGCGCCAGC AGCTGATCGA GACTGTCGAG
20 TACTCGTTGC CTAACAAGCA CTATTCGAA ATCGACCTGA GCTGGCACAA
GGGCCTCCAA AACACCGGCA AGAACGCCGA GGTCTTCGCT CCTCAGTCGG
ACCCCAACGG TCTGATCAAG TGTACCGTCG GCCGGTCCTC TCTGAAGTCT
AAATTG.

25 11. Gène recombinant selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il permet une expression dans les cellules eucaryotes.

30 12. Gène recombinant selon la revendication 11, caractérisé en ce que ladite séquence d'ADN contient la séquence ci-après :

35 ATGTCTGCTG TTAAGGCTGC TAGATACGGT AAGGACAACG TTAGAGTCTA
CAAGGTTCAC AAGGACGAGA AGACCGGTGT CCAGACGGTG TACGAGATGA
CCGTCTGTGT GCTTCTGGAG GGTGAGATTG AGACCTCTTA CACCAAGGCC
GACAACAGCG TCATTGTCGC AACCGACTCC ATTAAGAACCA CCATTTACAT
CACCGCCAAG CAGAACCCCCG TTACTCCTCC CGAGCTGTTG GGCTCCATCC
TGGGCACACA CTTCATTGAG AAGTACAACC ACATCCATGC CGCTCACGTC

AACATTGTCT GCCACCGCTG GACCCGGATG GACATTGACG GCAAGCCACA
 CCCTCACTCC TTCATCCGCG ACAGCGAGGA GAAGCGGAAT GTGCAGGTGG
 ACGTGGTCGA GGGCAAGGGC ATCGATATCA AGTCGTCTCT GTCCGGCCTG
 ACCGTGCTGA AGAGCACCAA CTCGCAGTTC TGGGGCTTCC TGCGTGACGA
 05 GTACACCACA CTTAAGGAGA CCTGGGACCG TATCCTGAGC ACCGACGTG
 ATGCCACTTG GCAGTGGAAAG AATTCAGTG GACTCCAGGA GGTCCGCTCG
 CACGTGCCTA AGTTCGATGC TACCTGGGCC ACTGCTCGCG AGGTCACTCT
 GAAGACTTT GCTGAAGATA ACAGTGCCAG CGTGCAGGCC ACTATGTACA
 AGATGGCAGA GCAAATCCTG GCGCGCCAGC AGCTGATCGA GACTGTGAG
 10 TACTCGTTGC CTAACAAGCA CTATTCGAA ATCGACCTGA GCTGGCACAA
 GGGCCTCCAA AACACCGGCA AGAACGCCGA GGTCTTCGCT CCTCAGTCGG
 ACCCCAACGG TCTGATCAAG TGTACCGTGC GCCGGTCCTC TCTGAAGTCT
 AAATTG.

13. Gène recombinant selon la revendication 8, caracté-
 15 risé en ce qu'il permet une expression dans les cellules animales.

14. Gène recombinant selon la revendication 13, caracté-
 risé en ce que ladite séquence d'ADN comprend la séquence
 ci-après :

20	-ATGTC	CGCAGTAAAA	GCAGCCCCT	ACGGCAAGGA
	CAATGTCCGC	GTCTACAAGG	TTCACAAGGA	CGAGAAAGACC
	CGGTGTACGA	GATGACCGTC	TGTGTGCTTC	TGGAGGGTGA
	TCTTACACCA	AGGCCGACAA	CAGCGTCATT	GTCGCAACCG
	GAACACCATT	TACATCACCG	CCAAGCAGAA	CCCCGTTACT
25	TGTTGGCTC	CATCCTGGC	ACACACTTC	TTGAGAAAGTA
	CATGCCGCTC	ACGTCAACAT	TGTCTGCCAC	CGCTGGACCC
	TGACGGCAAG	CCACACCCCTC	ACTCCTTCAT	CCGCGACAGC
	GGAATGTGCA	GGTGGACGTG	GTCGAGGGCA	AGGGCATCGA
	TCTCTGTCCG	GCCTGACCGT	GCTGAAGAGC	ACCAACTCGC
30	CTTCCTGCGT	GACGAGTACA	CCACACTAA	GGAGACCTGG
	TGAGCACCGA	CGTCGATGCC	ACTTGGCAGT	GGAAAGAATT
	CAGGAGGTCC	GCTCGCACGT	GCCTAAGTTC	GATGCTACCT
	TCGCGAGGTC	ACTCTGAAGA	CTTTGCTGA	AGATAAACAGT
	AGGCCACTAT	GTACAAGATG	GCAGAGCAAA	TCCCTGGCGCG
35	ATCGAGACTG	TCGAGTACTC	GTTGCCTAAC	CCAGCAGCTG
			AAGCACTATT	TCGAAATCGA

CCTGAGCTGG CACAAGGGCC TCCAAAACAC CGGCAAGAAC GCCGAGGTCT
TCGCTCCTCA GTCGGACCCC AACGGTCTGA TCAAGTGTAC CGTCGGCCGG
TCCTCTCTGA AGTCTAAATT G

05 précédée d'une séquence 5' non traduite favorable à l'expression dans les cellules animales.

15. Gène recombinant selon la revendication 14, caractérisé en ce que la séquence 5' non traduite favorable à l'expression dans les cellules animales comprend la séquence : AGCTTGCCGCCACT
10 située immédiatement en amont de la séquence explicitée dans la revendication 14.

16. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il porte, avec les moyens nécessaires à son expression, un gène recombinant selon l'une quelconque des revendications 8 à 15.

15 17. Vecteur d'expression selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il porte au moins un marqueur de sélection.

18. Vecteur d'expression selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il a les caractéristiques de l'un des plasmides pEMR469, pEMR473 et pEMR515.

20 19. Micro-organismes procaryotes, caractérisés en ce qu'ils sont transformés par un vecteur d'expression selon la revendication 16, portant un gène recombinant selon la revendication 9.

25 20. Cellules eucaryotes, caractérisées en ce qu'elles sont transformées par l'un des vecteurs d'expression selon l'une des revendications 16 à 18 portant le gène recombinant selon la revendication 11.

21. Souche de *Saccharomyces cerevisiae*, caractérisée en ce qu'elle est transformée par l'un des vecteurs d'expression selon l'une des revendications 16 à 18.

30 22. Souche selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle porte une mutation sur au moins l'un des gènes responsables de la synthèse de la leucine ou de l'uracile.

23. Souche selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle porte une mutation sur au moins l'un des gènes LEU2 et
35 URA3.

24. Procédé pour obtenir de l'urate oxydase recombinante, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes ci-après :

1) mise en culture d'une souche selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 ;

05 2) lyse de cellules ;

3) isolement et purification de l'urate oxydase recombinante contenue dans le lysat.

25. Cellules animales, caractérisées en ce qu'elles contiennent, avec les moyens nécessaires à son expression, un gène recombinant selon la revendication 13.

10 26. Cellules animales, caractérisées en ce qu'elles contiennent un vecteur d'expression selon la revendication 16, portant un gène recombinant selon la revendication 14.

1/15

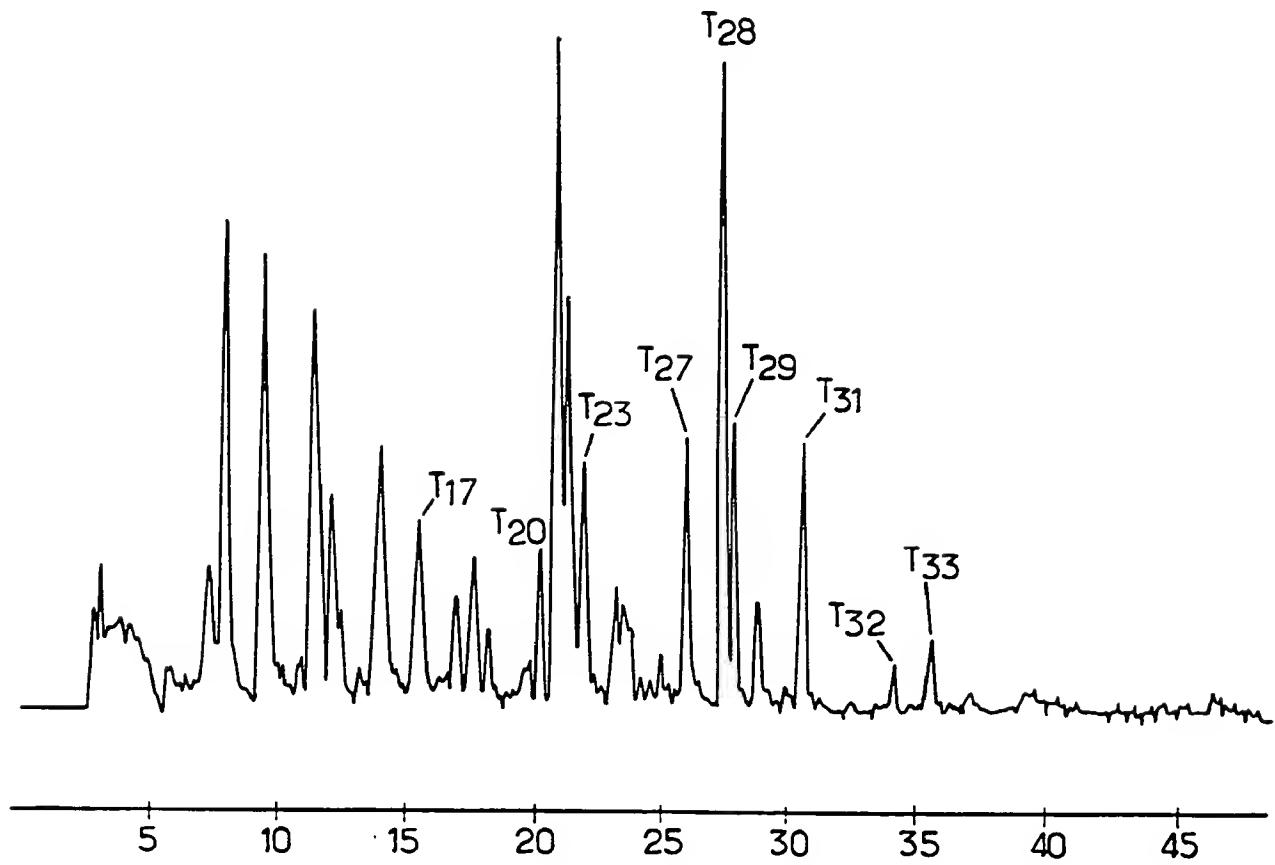


FIG. 1

Profil d'élution par mesure de la densité optique à 218 nm
du produit de la digestion tryptique de l'urate oxydase

2 / 15

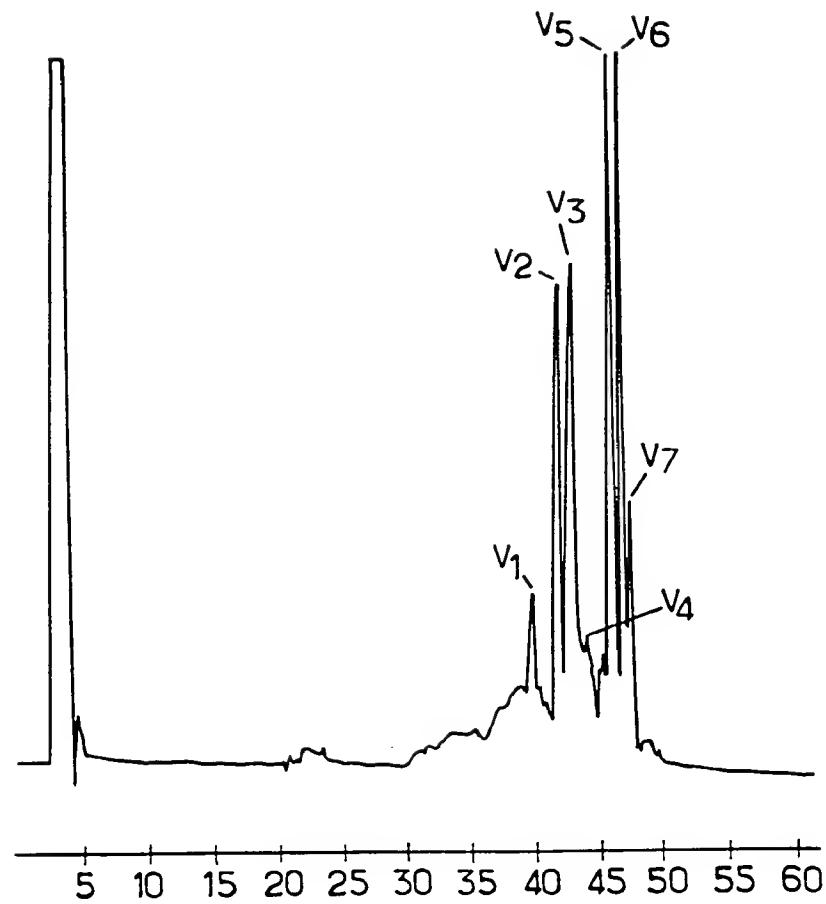


FIG. 2

Profil d'élution par mesure de la densité optique à 218 nm
du produit de la digestion par la protéase V8 de l'urate oxydase

FEUILLE DE REMPLACEMENT

3 / 15

1	AAACCCCTCACTGCCCTCTCATTCCTCATTCCTCG	GTGCCCCGATCCTCAATCCAACCTGTACA	60
61	TAACCTCTCCAACTCTCTGCTATATCCTTC	ATATTCCATACTACAAGATGTCCCGACTA	120
121	AAAGGAGGGCTACGGCAAGAACATGTC	CGGGTCTACAAGGTTCACAAAGGAGAGAAG	180
181	ACCGGGTGTCCAGACGGGTACGAGATGACC	GTCTGTGTGCTTCTGGAGGGTAGGATTGAG	240
241	ACCTCTTACACCAAGGCCAACAGCGCTC	ATTGTGGCAACCGACTCCATTAGAACACCC	300
301	ATTTCACATCACGCCAACCGAGAACCCCGTT	ACTCCCTCCGAGCCTGTTGGCTCCATCCTG	360
361	GGCACACACACTCATTGAGAAGTACAACAC	ATCCATGCCGCTCACGTCACATTGTCATGC	420
421	CACCCCTGGACCCGGATGGACATGACGGC	AAGCCACACCCCTCACTCCCTCATCCGCAC	480
481	AGCGAGGAGAAGGGAAATTGTGCAGGTGGAC	^{A*} GTGGTCGAGGGCAAGGGCATCGATATCAAG	540
541	TCGTCTCTGTCCGGCCTGACCCGTCTGAAG	AGCACCAACTCCGAGTTCT1GGGGCTTCCTG	600
601	CGTGACGAGTACACCACACTTAAGGAGACC	TGGGACCCGTATCCTGAGCACCGACGTCGAT	660
661	GCCACTTGGCAGTGGAAAGAAATTTCAGTGGA	CTCCAGGGAGGTCCGCTGGCACGTGCCCTAAG	720
721	TTCGATGCTACTGGCCACTATGTCGGAG	GTCACCTCTGAGAAGACTTTGCTGAAGATAAC	780
781	AGTGGCCAGCGTGCAGGGCAACTATGTCACAAAG	ATGGCAGAGCAAAATCCTGGGGCCAGCAG	840
841	CTGATCGAGACTGTGCGAGTACTCGTTGCCCT	AACAAGGACTATTTGCAAAATCGACCTGAGC	900
901	^{G*} TGGCACAAAGGGCTCCAAAACACCGGCAAG	AACGCCGAGGTCTTCGCTCAGTCGGAC	960
961	CCCAACGGTCTGATCAAGTGTACCGGTGGC	CGGTCTCTCTGAGTCTAAATTGTAACC	1020
1021	AACATGATTCTCACGGTCCGGAGTTCCAA	GGCAAACGTATATAGTCTGGGATAGGGTA	1080
1081	TAGGCAATTCACTTGTTTTACTTCCA	AAAAAAA...	

Séquence nucléotidique du clone 9C et d'une

partie du clone 9A

FIG. 3

↓ : début du clone 9A

4 / 15

109 ATGTCGGCAGTAAAGCAGCCGGTACGGC 168
 1 Met Ser Ile Val Ile Arg Tyr Gly Lys Asp Asn Val Arg Val Tyr Lys Val His 20

 169 AAGGACGAGAAGACCCGTGTCCAGACGGTG 228
 21 Lys Asp Glu Ile Thr Gly Val Glu Thr Val Ile Val Cys Ile Val Leu Glu 40

 229 GGTGAGATTGAGACCTTACACCAAGGCC 288
 41 Gly Glu Ile Glu Thr Ser Tyr Ile Ala Asp Asn Ser Val Ile Val Ala Thr Asp Ser 60

 289 ATTAGAACACCCATTACATCACCGCCAAAG 348
 61 Ile Ile Asn Thr Ile Tyr Ile Thr Ile Ile Asp Gly Ser Ile Leu Glu 80

 349 GGCTCCATCCTGGCACACACATTCAATTGAG 408
 81 Gly Ser Ile Leu Glu Thr His Phe Ile Glu Lys Tyr Asn His Ile His Ala Ala His Val 100

 409 AACATTGTCGCCACCCGCTGGACCCGGATG 468
 101 Asn Ile Val Ile Cys Ile Arg Trp Thr Arg Met Asp Ile Asp Gly Ile Asp Gly Ser His Pro His Ser Pro His 120

 469 TTCATCGCGAACAGGGAGAACGGGAAT 528
 121 Phe Ile Arg Asp Ser Gly Glu Ile Arg Asn Val Ile Val Asp Val Ile Val Ile Gly 140

 529 ATCGATATCAAGTCGTCCTCTGGCCTG 588
 141 Ile Asp Ile Lys Ser Ser Leu Ser Gly Leu Thr Val Ile Lys Ser Thr Asn Ser Glu Phe ^{T31} 160

 589 TGGGGCTTCCTGGTGAACGGTACACACA 648
 161 Trp Gly Phe Leu Arg Asp Ser Gly Glu Ile Tyr Ile Thr Leu Lys Glu Thr Trp Asp Arg Ile Leu Ser 180

 649 ACCGACGTCCGATGCCACTTGGCAGTGGAAAG 708
 181 Thra Sp Val Asp Ile Asp Val Asp Ile Asp Val Arg Lys Leu Glu Val Arg Ser 200

FIG. 4 (voir suite)

709	CACGTGCCTAAGTTCGATGCTTACCTGGCC	ACTGCTCGGAGGTCACTCTGAAGACTTT	768	
201	His ^a ValProLysPheAspPAlaThrTrpAla	ThrAlaArgGluValThrLeuLysThrPhe	220	
	<u>T23</u>	<u>↔</u>		
769	GCTGAAGATAACAGTGCCAGCGTGCAGGCC	ACTATGTAACAAGATGGCAGAGCAAATCCTG	828	
221	Ala ^a GluAspPAsnSerAlaSerValGlnAla	ThrMetTyr ^b LysMetAlaGluGlnIleLeu	240	
	<u>↔</u>	<u>V2</u>		
829	GCGGCCAGCAGCTGATCGAGACTGTGAG	TACTCGTGTGCCTAACAGCACTATTGCAA	888	
241	Ala ^a ArgGlnGlnLeuIleGlutThrValGlu	TyrSerLeuProAsn ^b Only ^b His ^b TyrPheGlu	260	
	<u>↔</u>	<u>V1</u>	<u>↔</u>	<u>T29/</u>
889	ATCGACCTGAGCTGGCACAAAGGCCCTCCAA	AAACACCGGCCAGAACGCCCCAGGTCTTCGCT	948	
261	Ile ^a AspLeuSerTrpHis ^b LysGlyLeuGln	AsnThrGlyLysAsnAlaGluValPheAla	280	
	<u>T27</u>	<u>↔</u>	<u>↔</u>	
949	CCTCAGTGGACCCCCAACGGTCTGATCAA	TGTACCGTGGCCGGTCCTCTGAACTCT	1008	
281	ProGlnSerAspProAsnGlyLeuIleLeu ^a	Cys ^b Thr ^b ValGlyArgSerSerLeuLysSer	300	
1009	AAATTGTAA			
301	LysLeuEnd			

FIG. 4 (suite)

Séquence d'ADN ouverte par l'ATG en position 109 sur la figure 3 et polypeptide codé.

Les peptides séquencés obtenus par hydrolyse de l'urate oxydase d'*A. flavus* à l'aide de la trypsin et de la protéase V8 sont représentés par des flèches en vis-à-vis du polypeptide codé selon

↔ : peptide tryptique
↔ - ↔ : peptide obtenu par hydrolyse à l'aide de la protéase V8.

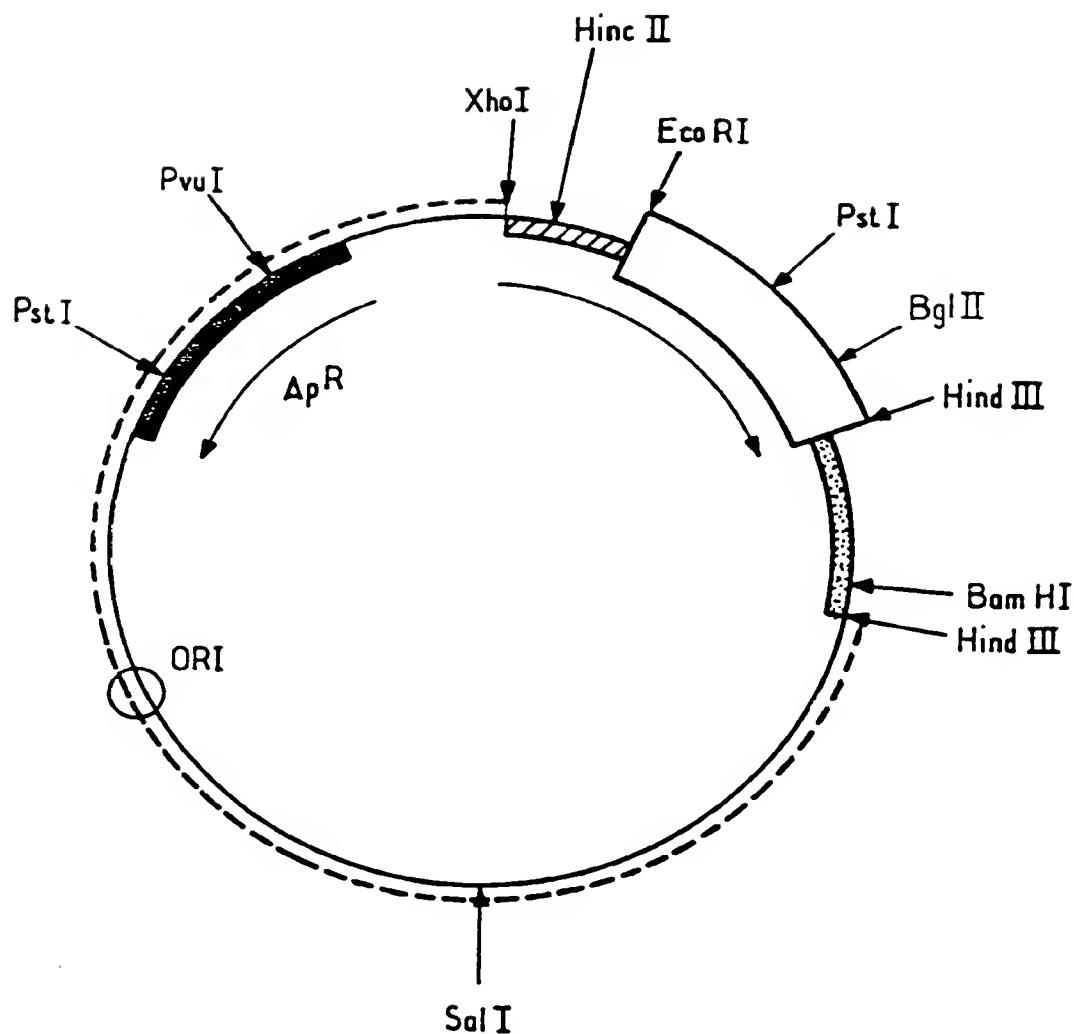


FIG. 5

Plasmide p 163,1

FEUILLE DE REMPLACEMENT

7 / 15

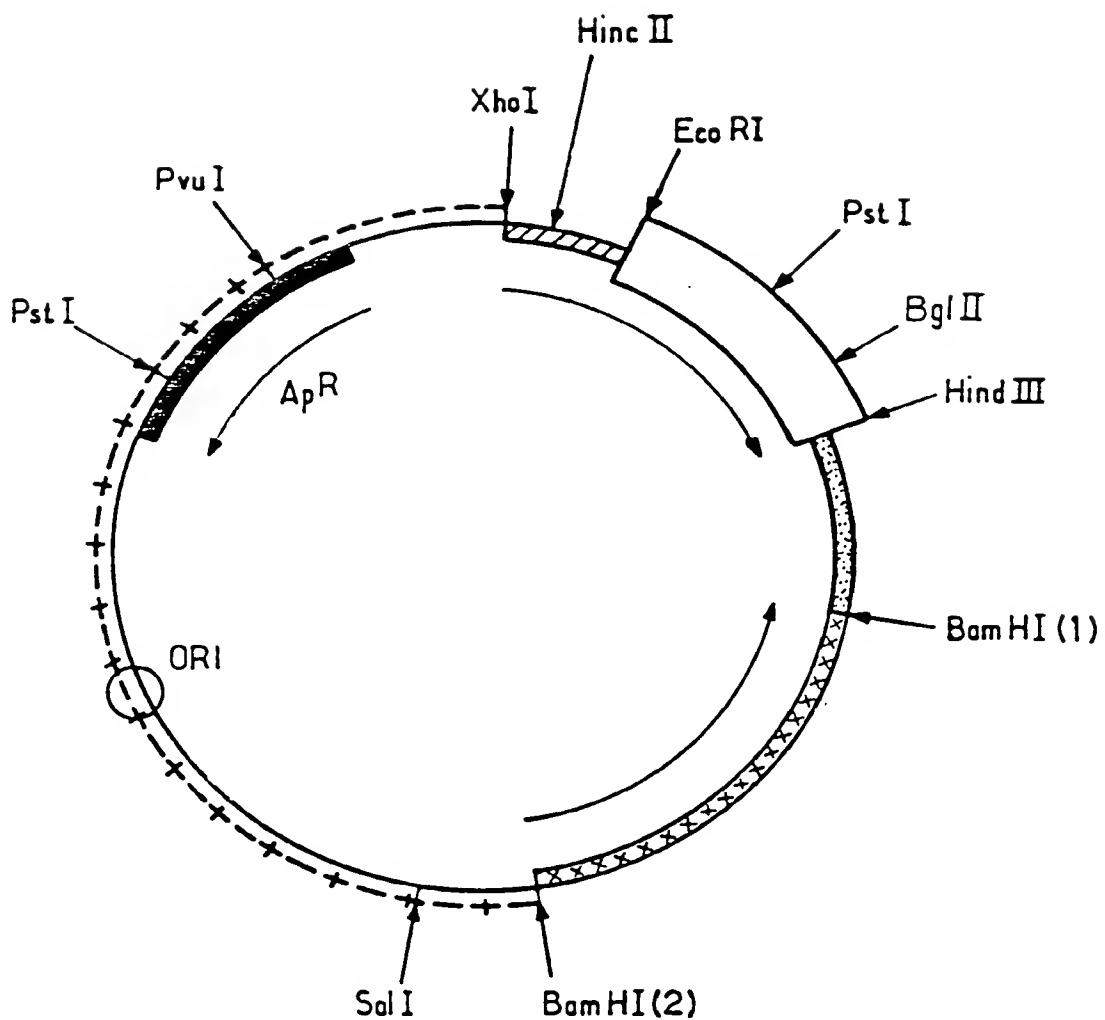


FIG. 6

Plasmide p 160

FEUILLE DE REMPLACEMENT

8 / 15

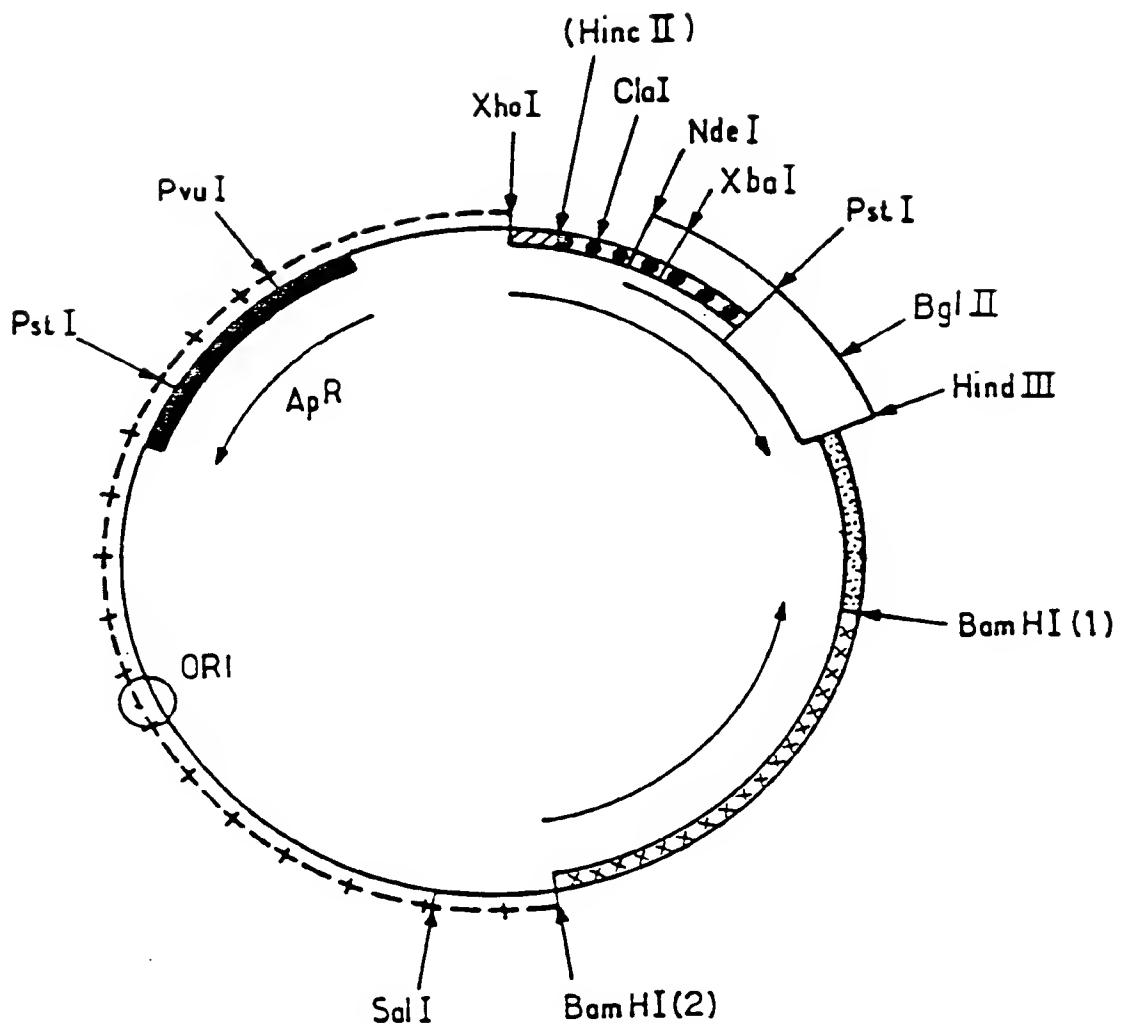


FIG. 7

Plasmide p 373,2

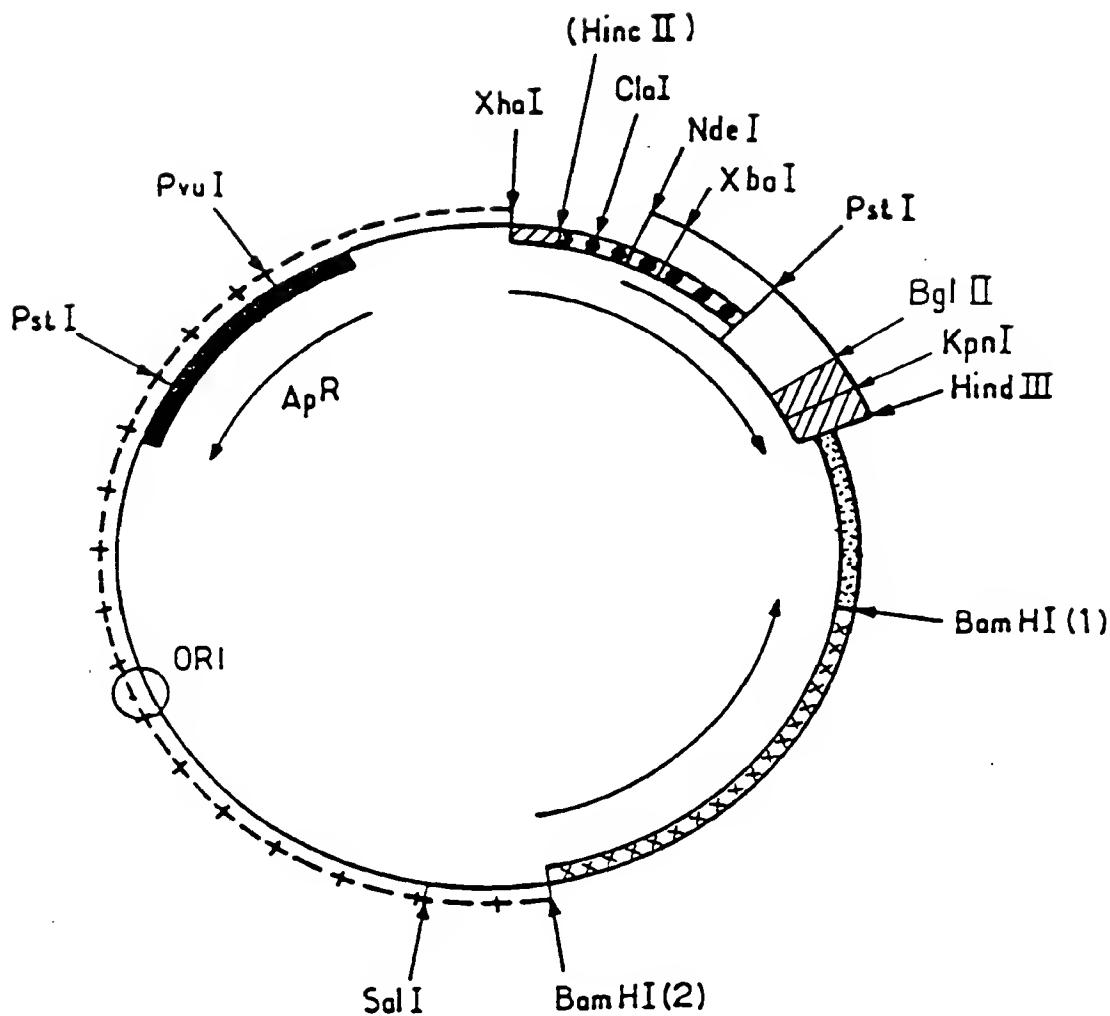


FIG. 8

Plasmide p 462

10 / 15

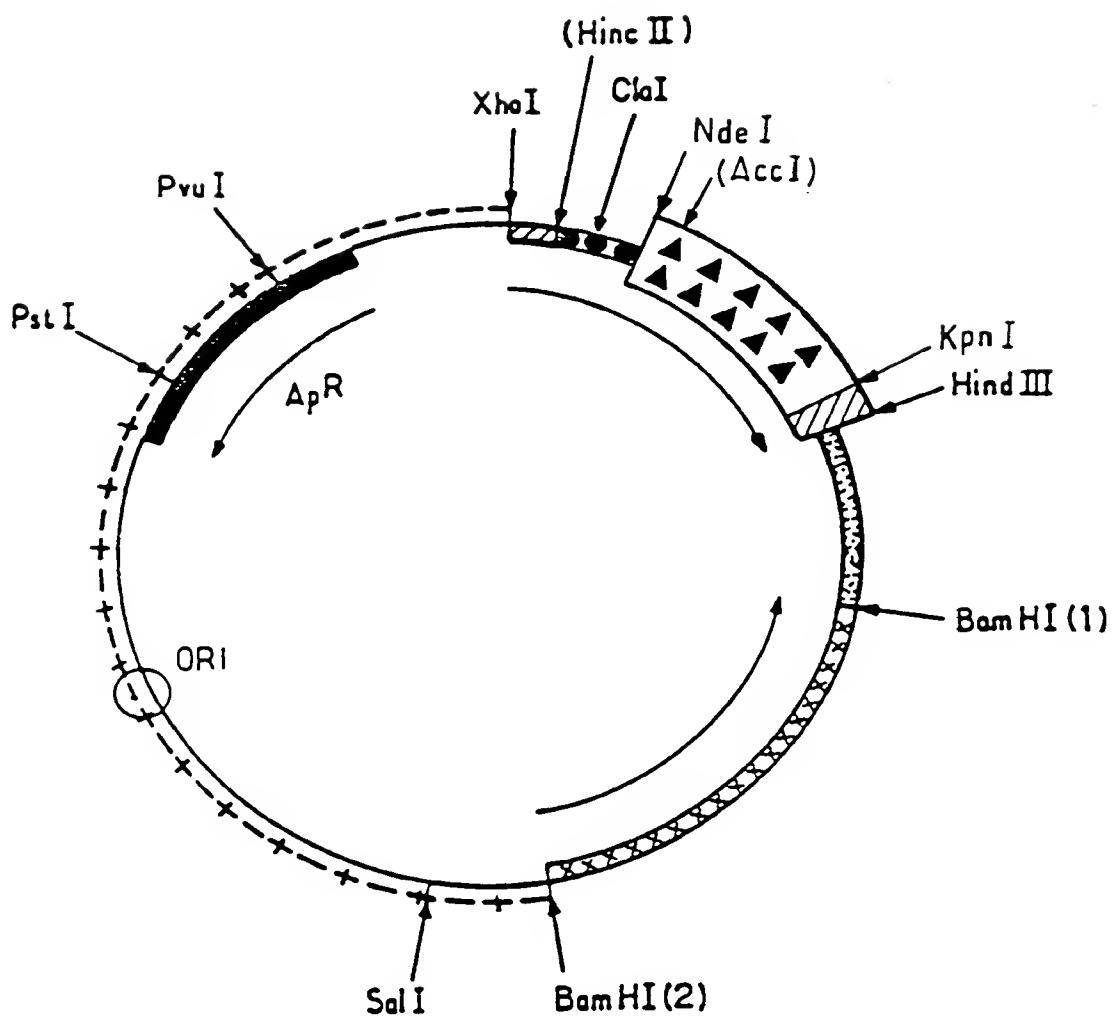


FIG. 9

Plasmide p 466

FEUILLE DE REMPLACEMENT

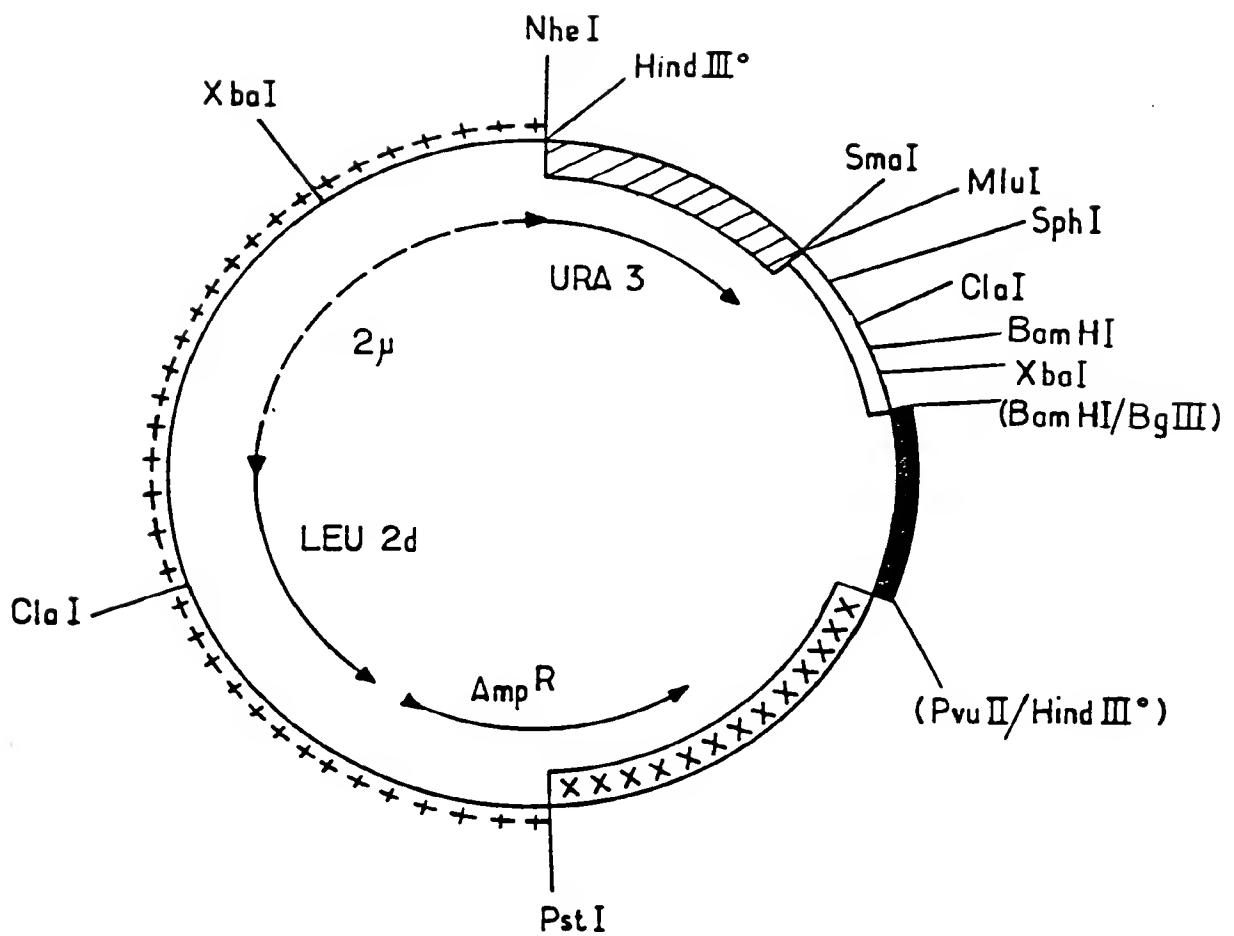


FIG.10

Plasmide pEMR 414

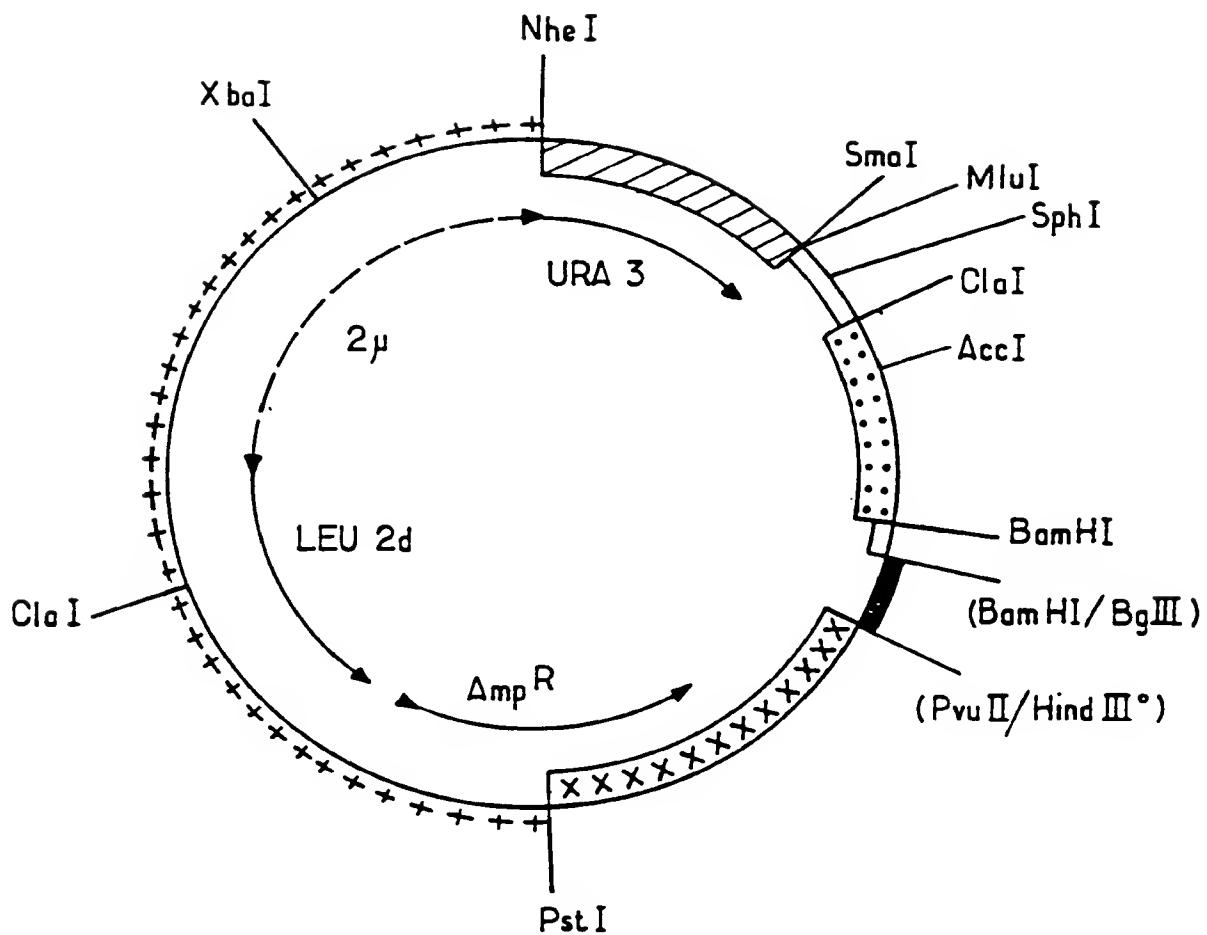


FIG.11

Plasmide pEMR 469

13 / 15

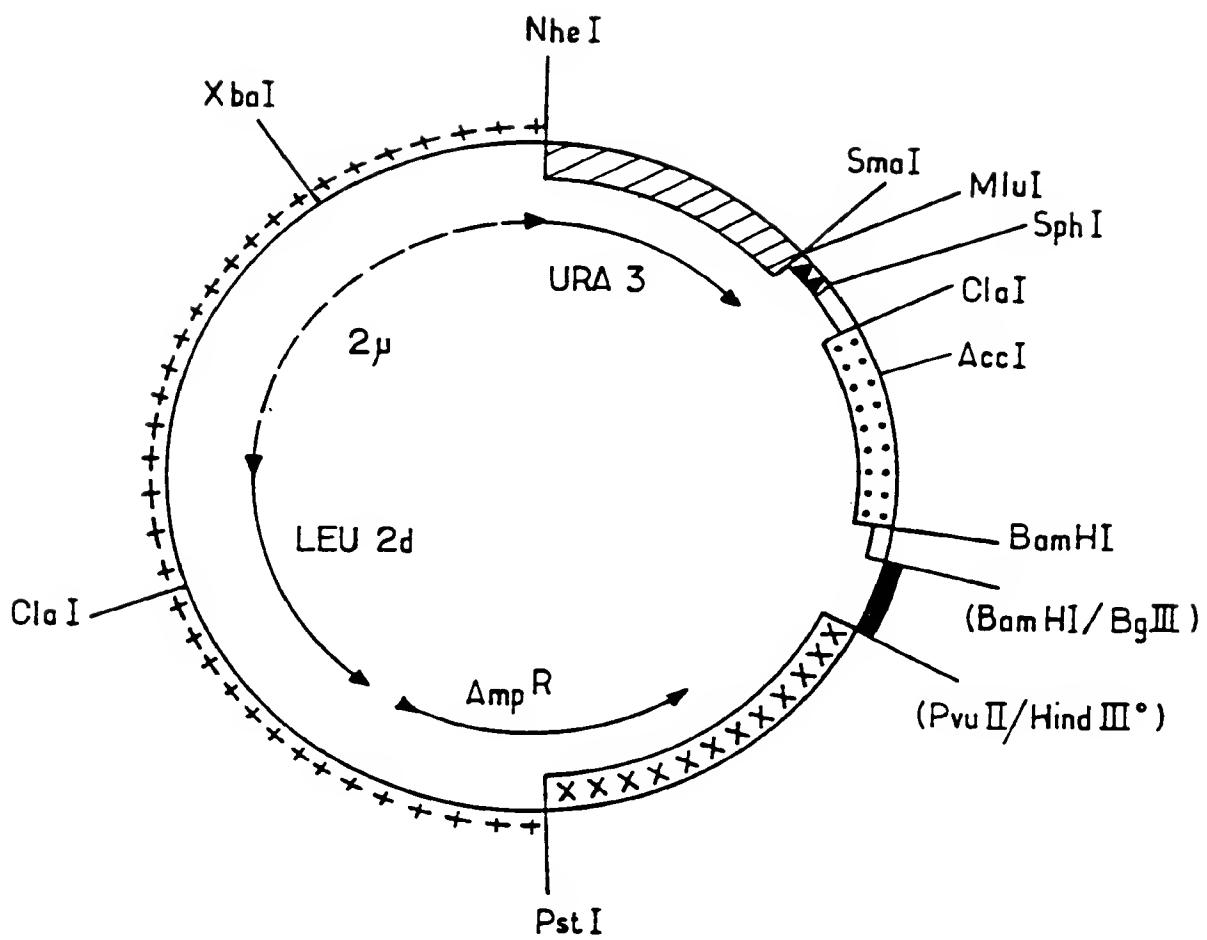


FIG.12

Plasmide pEMR 473

14 / 15

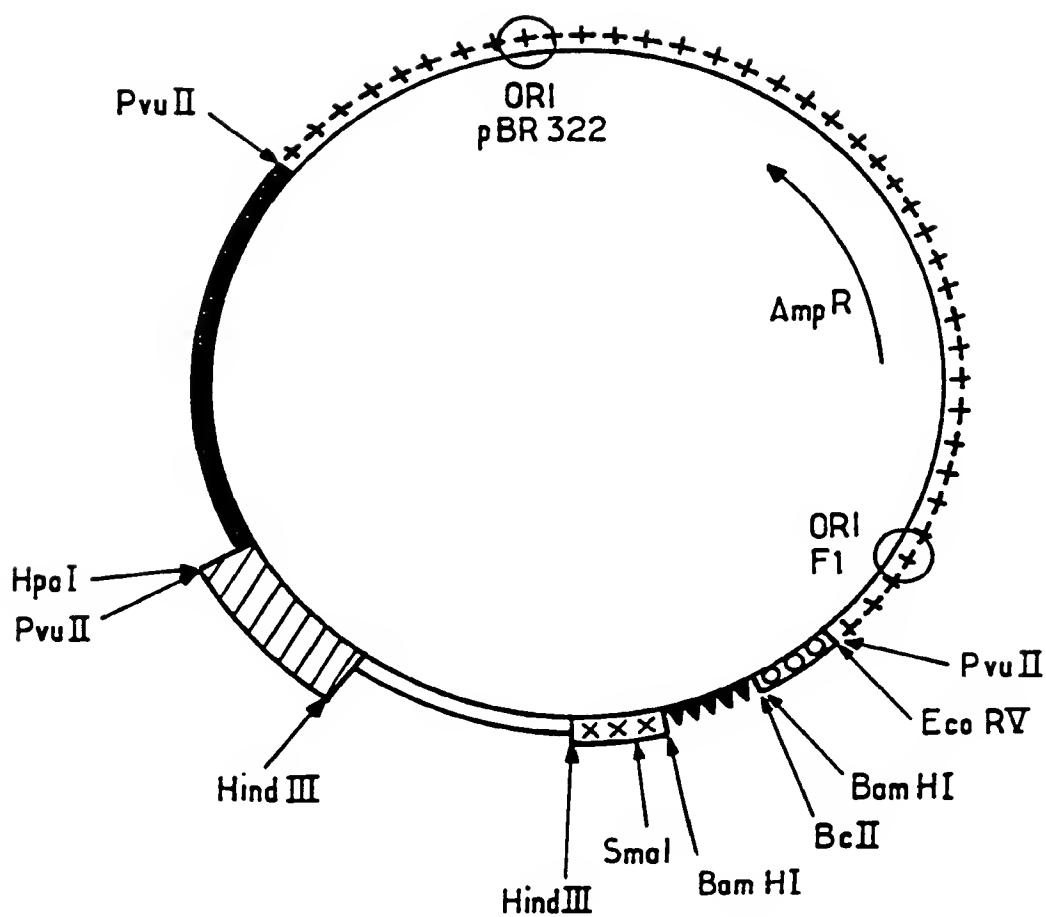


FIG.13

Plasmide PSE1

FEUILLE DE REMPLACEMENT

15 / 15

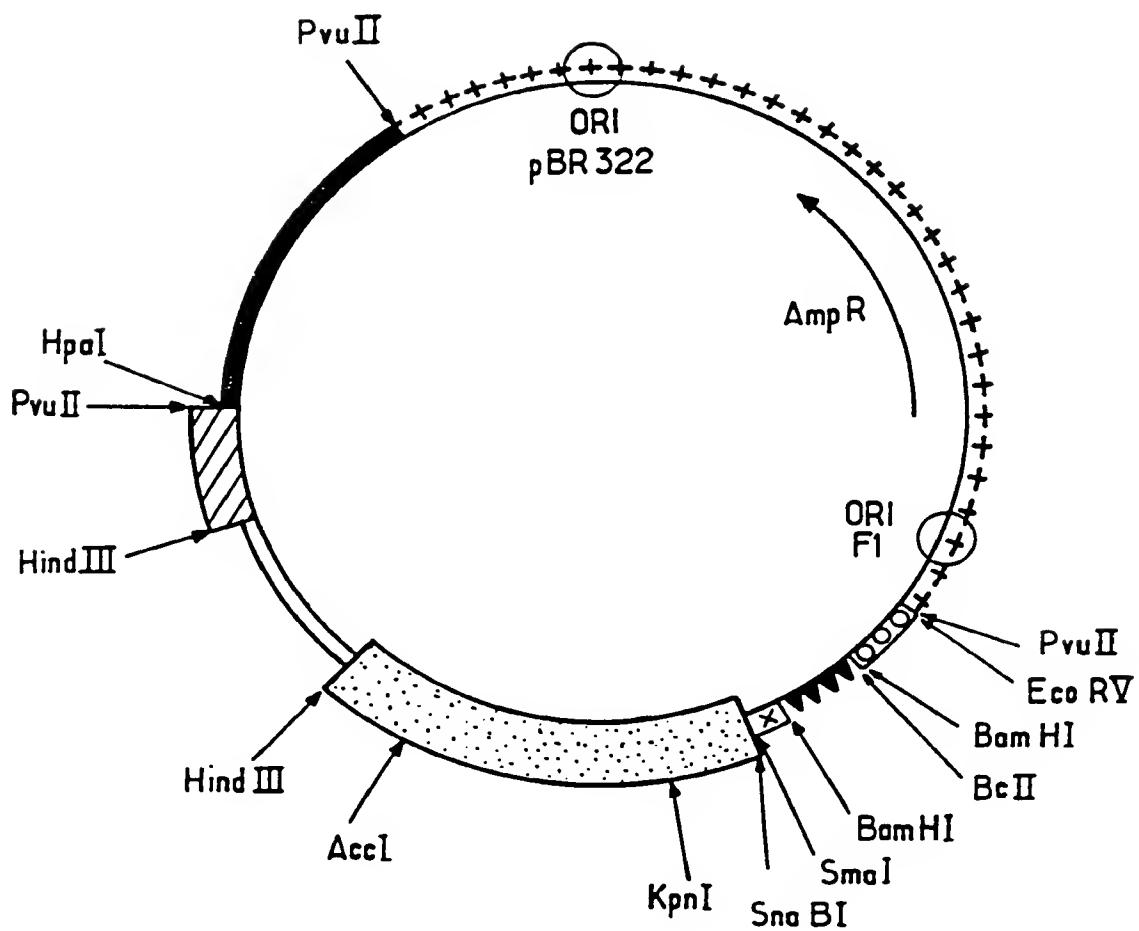


FIG.14

Plasmide pSV860

FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internationale Application No PCT/FR 90/00532

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *

According to Internationale Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

IPC⁵ C12N 15/53, C12N 9/06, A61K 37/50, C12N 1/19, C12N 1/21,
C12N 5/16, // (C12N 1/19, C12R 1:865)

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched *

Classification System	Classification Symbols
IPC ⁵	C 12 N, A 61 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *

Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	WO, A, 8808450 (B. FINLAYSON) 3 November 1988 see abstract; page 3, line 25 - page 5, line 3; page 13, line 5 - page 17, line 10; page 22, lines 1-21; claims 13,26,34,43,68-70,85,87,89	8-18,20,25, 26
A	---	7
X	GB, A, 1198764 (SOCIETE D'ETUDES ET D'APPLICATIONS BIOCHIMIQUES) 15 July 1970 see the whole document, in particular column 3, lines 39-41; examples	1-7
Y	---	8-18,20,25, 26
		. / ..

* Special categories of cited documents: ¹⁰

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Compilation of the Internationale Search	Date of Mailing of this Internationale Search Report
14 September 1990 (14.09.90)	15 October 1990 (15.10.90)
Internationale Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Character of Document, with indication, where appropriate, of the respective references	Reference to Claim No.
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 158, No. 3, 1989, Academic Press, Inc., (New York, US), K. Alvares et al.: "The nucleotide sequence of a fulllength cDNA clone encoding rat liver urate oxidase", pages 991-995 see figure 993 ---	1,8-10,19
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, December 1988, P. Gopal Reddy et al.: "Isolation and sequence determination of a cDNA clone for rat peroxisomal urate oxidase: liver-specific expression in the rat", pages 9081-9085 see page 9083, figure ---	1,8-10,19
A	DE, A, 3927061 (SAPPORO BREWERIES, LTD) 8 March 1990 see abstract; example 2; claims ---	1,8-10,16, 17, 19
A	EP, A, 0173378 (UNILEVER NV) 5 March 1986 see the whole document in particular page 38, line 36 and claims 1-4,7,11,13,16,23 -----	1,8-12,16, 20,21

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9000532
SA 39005

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 05/10/90
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A- 8808450	03-11-88	None		
GB-A- 1198764	15-07-70	BE-A- 712846 DE-A- 1642656 FR-M- 6301 FR-A- 1529675 NL-A- 6804365 US-A- 3810820 US-A- 3620923		31-07-68 19-05-71 09-09-68 30-09-68 14-05-74 16-11-71
DE-A- 3927061	08-03-90	JP-A- 2053488 GB-A- 2221910		22-02-90 21-02-90
EP-A- 0173378	05-03-86	JP-A- 61092569		10-05-86

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 90/00532

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et le CIB

CIB⁵ : C 12 N 15/53, C 12 N 9/06, A 61 K 37/50, C 12 N 1/19,
C 12 N 1/21, C 12 N 5/16, // (C 12 N 1/19, C 12 R 1:865)

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation minimale consultée ⁸

Système de classification	Symboles de classification
CIB ⁵	C 12 N, A 61 K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰

Catégorie ¹¹	Identification des documents cités. ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications vues ¹³
Y	WO, A, 8808450 (B. FINLAYSON) 3 novembre 1988 voir abrégé; page 3, ligne 25 - page 5, ligne 3; page 13, ligne 5 - page 17, ligne 10; page 22, lignes 1-21; revendications 13,26,34,43,68-70,85, 87,89	8-18,20,25, 26
A	---	7
X	GB, A, 1198764 (SOCIETE D'ETUDES ET D'APPLICATIONS BIOCHIMIQUES) 15 juillet 1970 voir le document en entier, en particulier colonne 3, lignes 39-41; exemples	1-7
Y	---	8-18,20,25, 26
		./.

* Catégories spéciales de documents cités: ¹¹

- ** A Document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- ** E Document extérieur, mais oublié à la date de dépôt international ou après cette date
- ** L Document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- ** O Document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- ** P Document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

* T Document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constitutifs la base de l'invention

* X Document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

* Y Document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour un personne du métier.

* & Document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 Septembre 1990

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15. 10. 90

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

H. Ballesteros

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, volume 158, no. 3, 1989, Academic Press, Inc., (New York, US), K. Alvares et al.: "The nucleotide sequence of a full length cDNA clone encoding rat liver urate oxidase", pages 991-995 voir figure 993 --	1,8-10,19
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volume 85, décembre 1988, P. Gopal Reddy et al.: "Isolation and sequence determination of a cDNA clone for rat peroxisomal urate oxidase: liver-specific expression in the rat", pages 9081-9085 voir page 9083, figure --	1,8-10,19
A	DE, A, 3927061 (SAPPORO BREWERIES, LTD) 8 mars 1990 voir abrégé; exemple 2; revendications --	1,8-10,16, 17,19
A	EP, A, 0173378 (UNILEVER NV) 5 mars 1986 voir le document en entier, en particulier page 38, ligne 36 et revendications 1-4,7,11,13,16,23 -----	1,8-12,16, 20,21

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9000532
SA 39005

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 05/10/90
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A- 8808450	03-11-88	Aucun		
GB-A- 1198764	15-07-70	BE-A- 712846	31-07-68	
		DE-A- 1642656	19-05-71	
		FR-M- 6301	09-09-68	
		FR-A- 1529675		
		NL-A- 6804365	30-09-68	
		US-A- 3810820	14-05-74	
		US-A- 3620923	16-11-71	
DE-A- 3927061	08-03-90	JP-A- 2053488	22-02-90	
		GB-A- 2221910	21-02-90	
EP-A- 0173378	05-03-86	JP-A- 61092569	10-05-86	

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS
RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE		Cote du dossier du déposant ou du mandataire H2233-C482+501+03/MLG/CCE
Demande internationale N° PCT/FR 90/00532	Date de dépôt international 13 juillet 1990	
Office récapteur RO/FR	Date de priorité revendiquée 13 juillet 1989, 29 décembre 1989, 6 février 1990	
Déposant SANOFI et al.		
I. <input type="checkbox"/> IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT PAS FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE ¹ (Observations sur la feuille supplémentaire 2))		
II. <input type="checkbox"/> IL Y A ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ² (Observations sur la feuille supplémentaire 2))		
III. TITRE, ABRÉGÉ ET FIGURE DES DESSINS		
1. Les éléments indiqués ci-dessous sont approuvés tels qu'a soumis par le déposant ³ :		
<input checked="" type="checkbox"/> Titre <input checked="" type="checkbox"/> Abrégé		
2. Les textes des éléments suivants établis par l'administration chargée de la recherche internationale sont reproduits ci-dessous:		
<input type="checkbox"/> Titre <input type="checkbox"/> Abrégé		
<input type="checkbox"/> Le texte de l'abrégé se poursuit sur la feuille supplémentaire 1)		
3. a. <input type="checkbox"/> La teneur définitive de l'abrégé est établie par l'administration chargée de la recherche internationale sous la forme proposée dans la formulaire PCT/ISA/204 préalablement envoyé au déposant. b. <input type="checkbox"/> Le présent rapport est incomplet au cas où concerne l'abrégé car la délais accordé au déposant pour faire ses commandes sur le projet établi par l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas expiré. ⁴		
4. Figure à publier avec l'abrégé: ⁵		
Figure No. <u>4</u> <input type="checkbox"/> Aucune des figures		
<input type="checkbox"/> suggérée par le déposant <input checked="" type="checkbox"/> parce que le déposant n'a pas suggéré de figure <input type="checkbox"/> parce que cette figure caractérise mieux l'invention		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N° PCT/FR 90/00532

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB⁵ : C 12 N 15/53, C 12 N 9/06, A 61 K 37/50, C 12 N 1/19, C 12 N 1/21, C 12 N 5/16, // (C 12 N 1/19, C 12 R 1:865)

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation minimale consultée ⁸

Système de classification	Symboles de classification
CIB ⁵	C 12 N, A 61 K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰

Catégorie ¹¹	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
Y	WO, A, 8808450 (B. FINLAYSON) 3 novembre 1988 voir abrégé; page 3, ligne 25 - page 5, ligne 3; page 13, ligne 5 - page 17, ligne 10; page 22, lignes 1-21; revendications 13,26,34,43,68-70,85, 87,89	8-18,20,25, 26
A	---	7
X	GB, A, 1198764 (SOCIETE D'ETUDES ET D'APPLICATIONS BIOCHIMIQUES) 15 juillet 1970 voir le document en entier, en particulier colonne 3, lignes 39-41; exemples	1-7
Y	---	8-18,20,25, 26
	---	./.

* Catégories spéciales de documents cités: ¹¹

- « A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- « E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- « L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- « O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tout autre moyen
- « P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée.

« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

« X » document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

« Y » document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

« & » document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 septembre 1990

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15. 10. 90

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

H. Ballesteros

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, volume 158, no. 3, 1989, Academic Press, Inc., (New York, US), K. Alvares et al.: "The nucleotide sequence of a full length cDNA clone encoding rat liver urate oxidase", pages 991-995 voir figure 993 --	1,8-10,19
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volume 85, décembre 1988, P. Gopal Reddy et al.: "Isolation and sequence determination of a cDNA clone for rat peroxisomal urate oxidase: liver-specific expression in the rat", pages 9081-9085 voir page 9083, figure --	1,8-10,19
A	DE, A, 3927061 (SAPPORO BREWERIES, LTD) 8 mars 1990 voir abrégé; exemple 2; revendications --	1,8-10,16, 17,19
A	EP, A, 0173378 (UNILEVER NV) 5 mars 1986 voir le document en entier, en particulier page 38, ligne 36 et revendications 1-4,7,11,13,16,23 -----	1,8-12,16, 20,21

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9000532
SA 39005

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 05/10/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A- 8808450	03-11-88	None		
GB-A- 1198764	15-07-70	BE-A- 712846 DE-A- 1642656 FR-M- 6301 FR-A- 1529675 NL-A- 6804365 US-A- 3810820 US-A- 3620923	31-07-68 19-05-71 09-09-68 30-09-68 14-05-74 16-11-71	
DE-A- 3927061	08-03-90	JP-A- 2053488 GB-A- 2221910	22-02-90 21-02-90	
EP-A- 0173378	05-03-86	JP-A- 61092569		10-05-86

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.